

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und physikalische
Medizin

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. W. Hein



Deckung osteochondraler Gelenkflächendefekte durch gefäßgestielte
Periostlappen – eine experimentelle Studie am Kaninchenkniegelenk.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Markus Berginski

geboren am 2. März 1971 in Iserlohn.

Gutachter:

1. Prof. Hein
2. Prof. Holzhausen
3. Prof. Ascherl, Leipzig

eingereicht am: 30.10.2001

verteidigt am: 29.10.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004209

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004209>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Therapie osteochondraler Gelenkflächendefekte stellt bis heute ein ungelöstes Problem dar, da die angewandten Behandlungsmaßnahmen unbefriedigende Langzeitergebnisse hervorbringen. Die eigene tierexperimentelle Untersuchung soll feststellen, ob gefäßgestielte Periostlappen adulter Kaninchen in der Lage sind, sich in hyalinähnlichen Knorpel zu differenzieren und den mechanischen Alltagsbelastungen über einen Zeitraum von sechs Monaten standhalten. Anhand einer Vorversuchsreihe wird dazu ein Tiermodell entwickelt. Im Hauptversuch wird an neunzehn Tieren in Injektionsnarkose ein osteochondraler Defekt im femoropatellaren Gleitlager des rechten Kniegelenkes gesetzt, welcher mit gefäßgestielten bzw. freien Periostlappen vom medialen Femur versorgt wird. Das Periost wird mit der Kambiumzellschicht zum Gelenkinnern orientiert und mit Fibrinkleber befestigt. Die kontralaterale Gelenkfläche dient als Kontrolle. Die Tiere werden für sechs Monate unter Spontanbewegung gehalten. Nach Opferung werden die distalen Femuranteile beidseits entnommen und eine makroskopische, histologische und biochemische Analyse durchgeführt. Bei den durch gefäßgestielte Transplantate versorgten Defekten zeigen sich deutlich weniger degenerative Veränderungen als bei den freien Transplantaten, insgesamt zeigt sich jedoch die biologische Minderwertigkeit des Neoknorpels beider Gruppen gegenüber dem Gelenkknorpel. Die Methode der mikrovaskulär reanastomosierten Periostlappen erweist sich in diesem Versuch gegenüber den freien Transplantaten als überlegen, obwohl sich in keiner Gruppe originärer Gelenkknorpel bildet. Eine Qualitätsverbesserung des Ersatzgewebes durch Änderung der Versuchsbedingungen ist denkbar, insbesondere wenn eine Annäherung an embryonale und postnatale Wachstumsbedingungen zur Angleichung des Neoknorpels an den hyalinen Gelenkknorpel führt. Unter diesen Bedingungen wäre die Entwicklung einer klinisch relevanten Behandlungsmethode möglich.

Berginski, Markus: Deckung osteochondraler Gelenkflächendefekte durch gefäßgestielte Periostlappen – eine experimentelle Studie am Kaninchenkniegelenk.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Hyalines Knorpelgewebe	1
1.2	Anatomie des Periosts	6
1.3	Wissenschaftliche Erkenntnisse zum Versuchsvorhaben	8
2	Zielstellung	10
3	Material und Methodik	11
3.1	Methodisches Vorgehen und Dauer der Einzelversuche	11
3.2	Versuchsablauf	11
3.2.1	Gruppeneinteilung Vorversuch	12
3.2.2	Gruppeneinteilung Hauptversuch	13
3.2.3	Postoperative Beobachtungsphase	14
3.3	Biochemische Analyse	15
3.3.1	Wassergehalt der Gewebeproben	15
3.3.2	Säurehydrolyse von organischem Material	16
3.3.3	Versuchsdurchführung	18
3.3.4	Eichkurve	20
3.4.	Qualitätskontrolle des Verfahrens	20
3.4.1	Einfluß potentieller Störfaktoren	21
3.4.2	Hydrolyse im Zeitvergleich, Langzeitversuch	22
3.4.3	Temperatureinfluss auf die Hydroxyprolinbestimmung	23
3.5	Makroskopische Untersuchungen	24

	Seite
3.5.1 Makroskopisches Bewertungsschema	25
3.6 Histologische Untersuchungen	26
3.6.1 Darstellung der Färbungen	26
3.6.2 Azan-Färbung nach Heidenhaim	27
3.6.3 Safranin O-Färbung	28
3.6.4 Histologisches Bewertungsschema	29
3.7 Chemikalien, Geräte und Medikamente	32
3.8 Mathematische und statistische Auswertung	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Ergebnisse des Vorversuchs	33
4.2 Ergebnisse des Hauptversuchs	36
4.2.1 Postoperativer Verlauf	36
4.2.2 Wassergehalt der Gewebeproben	36
4.2.3 Gesamtkollagengehalt der Gewebeproben	37
4.2.4 Makroskopische Ergebnisse	38
4.2.5 Histologische Ergebnisse	39
5 Diskussion	47
6 Zusammenfassung	59
7 Literaturverzeichnis	61
8 Anlagen	70
9 Thesen	74

1 Einleitung

Die Therapie chondraler und osteochondraler Gelenkflächendefekte stellt bis heute ein ungelöstes Problem aufgrund der begrenzten Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes dar. Die Ergebnisse der bisherigen Verfahren zur biologischen Defektdeckung zeigen, dass sich ein Ersatzgewebe bildet, welches sich deutlich vom originären Gelenkknorpel hinsichtlich seiner biochemischen Zusammensetzung und der mechanischen Eigenschaften unterscheidet. Die Langzeitergebnisse sind häufig unbefriedigend. Die alternative Versorgung traumatischer und degenerativer Gelenkschäden durch Endoprothesen ist gerade bei jungen Patienten nicht Mittel der Wahl, da über den langen Tragezeitraum eine mögliche Toxizität durch das implantierte Material genauso befürchtet werden muß wie eine Prothesenlockerung.

Ein klinisch anerkanntes Verfahren, welches zur biologischen Rekonstruktion von Gelenkoberflächendefekten und zur Bildung von originärem Gelenkknorpel führt, existiert nicht [Mow et al., 1991; Curtin et al., 1992; Hsu et al., 1992; Moran et al., 1992; Messner und Gillquist, 1993; Hartig et al., 1994; Kreder et al., 1994; Noguchi et al., 1994; Ritsilä et al., 1994]. Diese Gründe sind der Ausgangspunkt für das ständige Bemühen neue biologische Behandlungskonzepte für die Therapie degenerativer und traumatischer Gelenkflächendefekte zu finden.

1.1 Hyalines Knorpelgewebe

Hyaliner Knorpel hat im frischen, unfixierten Zustand eine weiß-bläuliche Farbe und erscheint auf der Schnittfläche glasartig opak. Im gefäß- und nervenfreien ausdifferenzierten Gewebe treten die Zellen gegenüber der Extrazellulärmatrix massenmäßig zurück; ihr Volumenanteil liegt zwischen ein und zehn Prozent. Beim Menschen besteht wie bei anderen Vertebraten in der frühen Embryonalperiode der größte Teil des Skeletts aus hyalinem Knorpel (Primordialskelett). Nach Abschluss des Wachstums kommt Hyalinknorpel nur noch an den Gelenkflächen, im sternalen Anteil der Rippen, im Skelett der Nase

sowie in den mittleren und tiefen Luftwegen vor. Bei einigen rezenten Wirbeltieren (Knorpelfische) ist das Skelett zeitlebens aus hyalinem Knorpel aufgebaut.

Hyalinknorpel entwickelt sich aus dem Mesenchym. Im Bereich der Skelettanlage schließen sich die Mesenchymzellen bei gleichzeitiger Abnahme der Extrazellulärmatrix dichter zusammen und bilden ein Blastem. Nach der fünften Embryonalwoche setzt innerhalb des Blastems die erste Knorpelbildung in Form von "Vorknorpel" ein. Voraussetzung für die Entwicklung von Knorpelgewebe aus dem undifferenzierten Mesenchym ist die Ausbildung von Zellkontakten (Desmosomen). Die Zellen des Blastems bilden Extrazellulärmatrix mit dünnen Fibrillen, deren Durchmesser etwa zehn Nanometer beträgt. Die Vorknorpelzellen differenzieren sich zu Chondroblasten und diese zu Chondrozyten.

Knorpel zeigt in der pränatalen Entwicklung morphologische Unterschiede zum ausdifferenzierten Gewebe. Im embryonalen Knorpel liegen die Zellen dicht gepackt, ihr Volumenanteil ist höher als im ausgereiften Knorpel. Ein weiteres Charakteristikum ist die Vaskularisation des Gewebes, die im ausdifferenzierten Gewebe nicht vorkommt. An den Enden einiger Skelettanlagen mit desmaler Osteogenese entwickelt sich aus Mesenchym sogenannter Sekundärknorpel. Der Sekundärknorpel ist Wachstumszone für die Gelenkkörper, zum Beispiel am Kiefergelenk oder am Sternoklavikulargelenk. Die knorpelig präformierten Skelettanlagen werden von einem Perichondrium umhüllt.

Die Entwicklung reifer Knorpelzellen ist zunächst auf den zentralen Anteil der Skelettanlagen beschränkt. Innerhalb dieser "Knorpelbildungszentren" teilen sich die Zellen, und es entstehen isogene Knorpelzellgruppen. Die Knorpelzellen produzieren reichlich Extrazellulärmatrix, so dass die einzelnen isogenen Gruppen auseinanderrücken. Diese Art des Knorpelwachstums wird als interstitielles oder intussusceptionelles Wachstum bezeichnet. Es ist hauptsächlich für das Längenwachstum verantwortlich. Durch Einbeziehung weiterer Mesenchymzellen aus der Umgebung der Skelettanlage wächst diese durch Apposition in die Breite. Nach Ausdifferenzierung des Mesenchyms erfolgt appositionelles Wachstum von seiten undifferenzierter Zellen in der sogenannten chondrogenen Schicht des Perichondriums, aus denen sich Chondroblasten und Chondrozyten entwickeln können. Die

durch Apposition entstandenen Chondrozyten nehmen ihrerseits wieder am interstitiellen Wachstum teil, indem sie sich mitotisch teilen und isogene Gruppen bilden.

Auch nach Abschluss des Wachstums behalten die Zellen der chondrogenen Schicht im Perichondrium die Potenz, Knorpelzellen zu bilden. Chondrozyten liegen im hyalinen Knorpel meist in isogenen Gruppen. Diese ordnen sich in der Tiefe des Gewebes in Reihen, die senkrecht zum Perichondrium oder zur Oberfläche (Gelenkknorpel) ausgerichtet sind. In der Peripherie liegen die Zellen einzeln, sie sind relativ klein und spindelförmig. In der Tiefe haben Chondrozyten ovoide oder kugelige Form. Dort, wo sich zwei Zellen in einer isogenen Gruppe gegenüberliegen, sind sie abgeflacht und bilden Kugelsegmente.

Lichtmikroskopisch erscheint die Zelloberfläche glatt, elektronenmikroskopisch kann man kurze Zytoplasmafortsätze erkennen. Die Zellen haben untereinander keinen Kontakt. Der ovale Zellkern besitzt einen oder mehrere Nukleoli. Das Zytoplasma enthält lange, schmale Mitochondrien und wenige Filamente. An paraplasmatischen Einschlüssen kommen Lipidtropfen, Pigmentkörnchen sowie reichlich Glykogengranula vor. Golgi-Apparat und rauhes endoplasmatisches Retikulum sind in Zellen, die Extrazellulärmatrix produzieren, stark entwickelt. Daneben kann man Vakuolen, Sekretgranula und Lysosomen beobachten. Die Extrazellulärmatrix des hyalinen Knorpels wird von Chondroblasten und Chondrozyten produziert. Sie besteht aus Wasser, Proteoglykanen, Kollagenfibrillen, Glykoproteinen, Lipiden und Elektrolyten.

Der Wasseranteil kann 70 bis 75% des Gesamtvolumens betragen. Wasser wird von den Makromolekülen - vor allem von den Proteoglykanen - gebunden ("strukturiertes Wasser"). Kollagen macht etwa die Hälfte des Trockengewichtes der Extrazellulärmatrix aus und besteht zu 90 bis 95% aus Typ-II-Kollagen. Der Fibrillendurchmesser variiert stark. Im Gelenkknorpel liegt er zwischen vier und 200 Nanometer. In den tiefen Schichten des Gelenkknorpels ordnen sich dünnere Fibrillen mit einem Durchmesser zwischen vier bis zehn Nanometer konzentrisch in der Umgebung der Zellen um die proteoglykanreiche perizelluläre Matrix. Da Kollagen den gleichen Brechungsindex besitzt wie die übrigen Bestandteile der umgebenden Matrix, sind die Fibrillen bei üblicher lichtmikroskopischer

Untersuchung nicht sichtbar. Wie diese "Maskierung" der Fibrillen zustandekommt, ist nicht vollständig geklärt; möglicherweise spielen der Gehalt an Chondroitinsulfaten und das daran gebundene Wasser eine Rolle. Die Fibrillen zeigen im Polarisationsmikroskop positive Doppelbrechung. Kollagenfibrillen des Knorpels haben eine typische Ausrichtung. Im Gelenkknorpel sind sie arkadenförmig angeordnet.

Die einzelnen Proteoglykanmonomere sind im Hyalinknorpel an Hyaluronsäuremoleküle gebunden und bilden auf diese Weise Proteoglykanpolymere. Ihre Glykosaminoglykane bestehen größtenteils aus Chondroitin-4-Sulfat (Typ A) und Chondroitin-6-Sulfat (Typ C) sowie aus Keratansulfat. Sie sind verantwortlich für die starke Basophilie der Extrazellulärmatrix. Der Proteoglykangehalt ist in der unmittelbaren Umgebung von Chondrozyten höher als zwischen den einzelnen Zellen und Zellgruppen. Entsprechend färbt sich die Extrazellulärmatrix peripher kräftig mit basischen Farbstoffen an. So entstehen dunkle "Höfe" um die Zellgruppen. Die Extrazellulärmatrix dieser Zone wird auch als "territoriale" Matrix bezeichnet.

Eine Gruppe von Knorpelzellen und die sie umgebende stark basophile territoriale Extrazellulärmatrix fasst man als Chondron zusammen. Die Extrazellulärmatrix zwischen den Territorien ist die "interterritoriale" Matrix. Sie ist weniger reich an Proteoglykanen und färbt sich entsprechend schwächer mit basophilen Farbstoffen an. Angaben über die Verteilung der Glykosaminoglykane, vor allem von Chondroitinsulfat und Keratansulfat, in der territorialen und interterritorialen Matrix sind im Schrifttum uneinheitlich und widersprüchlich. Einige Befunde sprechen dafür, dass Keratansulfat vorzugsweise in den Territorien, Chondroitinsulfat vermehrt in der interterritorialen Matrix vorkommt.

Hyaliner Knorpel wird - außer an den Gelenkflächen - vom Perichondrium umgeben. Es besteht aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe, in das die Kollagenfibrillen des Knorpels einstrahlen. Den Übergang zum Knorpelgewebe bildet die sogenannte chondrogene Schicht. Ihre Zellen tragen zum appositionellen Wachstum des Knorpels bei. Von den Zellen der chondrogenen Schicht kann die Wiederherstellung von Knorpelgewebe nach Verletzungen ausgehen. Bei Transplantationen sind die Zellen dieser Zone für die Neubildung von Knorpelgewebe

verantwortlich. Im Gegensatz zum Periost bildet das Perichondrium keine abgrenzbare Schicht, sondern geht kontinuierlich in das Knorpelgewebe über.

Ausdifferenzierter hyaliner Knorpel ist gefäßlos. Dort, wo Knorpelgewebe ein Perichondrium hat, wird es aus dessen Gefäßnetz durch Diffusion versorgt. Gelenkknorpel wird über die Synovia und aus den Gefäßen des subchondralen Knochengewebes ernährt. Die straffe perichondrale Bindegewebshülle verleiht den aus hyalinem Knorpel aufgebauten Skelettelementen große Elastizität. Fehlt das Perichondrium, bricht der Knorpel bei hoher Biegebeanspruchung.

Hyaliner Knorpel zeigt mehrere organspezifische regressive Veränderungen. Der Gehalt an Chondroitinsulfaten und Wasser nimmt bereits im mittleren Lebensalter ab. Im Rahmen dieser Veränderungen kommt es zur "Asbestfaserung" der Kollagenfibrillen. Diese sind dann lichtmikroskopisch "demaskiert" und werden als grobe Faserbündel sichtbar. Dort, wo die Fasern "körnig" zerfallen, kann es zu Gefäßeinsprossungen von seiten des Perichondriums kommen. Eine altersbedingte Veränderung der Extrazellulärmatrix ist auch die sogenannte albuminoide Entartung, bei der kleine doppelbrechende Eiweißkörper auftreten. Mit zunehmendem Lebensalter sterben vermehrt Knorpelzellen ab. Auch solche Anteile des Knorpelskeletts, die nicht an einer physiologisch ablaufenden endochondralen Osteogenese teilnehmen, können im Laufe des Lebens Mineralisation und Knochenbildung zeigen. Mineralisation der Extrazellulärmatrix tritt auch unabhängig von endochondraler Osteogenese auf. So kann man zum Beispiel im Knorpelskelett der Atemwege Ablagerung von Mineralien und Knochenbildung nebeneinander beobachten. Beginn und Art der Knochenbildung zeigen individuelle, geschlechts- und rassenspezifische Unterschiede.

Die Materialeigenschaften des Hyalinknorpels sind gemeinsame Funktion aller Bestandteile der Extrazellulärmatrix und in geringerem Ausmaß auch der Zellen. Hyaliner Knorpel leistet einer Kompression (zum Beispiel Gelenkdruck) Widerstand. Es treten dabei im Gewebe Druck- und Zugspannungen auf. Die Druckfestigkeit des Knorpelgewebes ist wesentlich höher als die Zugfestigkeit. Die allseitige Umwicklung der Knorpelzellen und Zellgruppen durch Kollagenfibrillen bestimmt die mechanischen Eigenschaften des Knorpels entscheidend mit. Unter Druckbelastung verhalten sich die Baueinheiten wie "Wasserkissen" oder

“Sprungfedern”. Die Fibrillen wirken der durch die Deformation herbeigeführten Zugbeanspruchung entgegen. Die Zellen selbst nehmen einen Teil der Druckspannungen auf. Den Hauptanteil an der Druckfestigkeit liefern die Proteoglykane und das an sie gebundene Wasser. Der Hyalinknorpel zeigt rheologisch ein viskoelastisches Verhalten. Veränderungen der Zusammensetzung und Verlust an Extrazellulärmatrix gehen mit einer Minderung der mechanischen Eigenschaften einher. Am Gelenknorpel zum Beispiel kommt es zu degenerativen Zerstörungen (Arthrose), wenn seine Widerstandsfähigkeit dem Gelenkdruck nicht mehr standhalten kann [Tillmann (a), 1987; Mow et al., 1991; O’Driscoll et al., 1997].

1.2 Anatomie des Periosts

Knochen werden außer an ihren gelenkbildenden Flächen und im Bereich chondral-apophysärer Sehnenansätze von Knochenhaut, dem Periost, bedeckt. Am Periost werden beim wachsenden Knochen drei Schichten unterschieden. Außen liegt lockeres Bindegewebe, das die Verbindung zwischen Knochen und angrenzenden Geweben herstellt (Adventitia). Die darauf folgende Schicht wird als Fibroelastika bezeichnet. Sie enthält geflechtartiges straffes Bindegewebe, dessen Kollagenfasern vorzugsweise in Längsachse der Skelettelemente verlaufen. Ein Teil der Faserbündel strahlt in die Kompakta ein (Sharpeysche Fasern). Dieser schafft eine feste Verbindung zwischen Periost und Knochen. Außer Kollagenfasern enthält die mittlere Schicht auch elastische Fasern, die an Flächen in Längsrichtung des Knochens, an Kanten und Vorsprüngen jedoch gitterförmig angeordnet sind. Die Zellen der Fibroelastika mit ihren “flügel förmigen” Fortsätzen gleichen Sehnenzellen. Die unmittelbar dem Knochen anliegende Schicht wird - in Analogie zur Wachstumszone in Pflanzenstengeln - als Kambiumschicht (Osteoblastenschicht) bezeichnet. Sie hebt sich beim wachsenden Knochen aufgrund ihres Zellreichtums deutlich von der Fibroelastika ab. In der Kambiumschicht lassen sich drei Zelltypen unterscheiden. Am Übergang zur Fibroelastika kommen spindelförmige “mesenchymale” Stammzellen vor, aus denen sich rundliche Kambiumzellen, Osteoprogenitorzellen, differenzieren. Aus Kambiumzellen entstehen spindelförmige Präoste-

blasten, die meistens einen Zellverband bilden. Osteoprogenitorzellen teilen sich mitotisch; sie gelten als Mutterzellen reifer Osteoblasten. Die Zellen der Kambiumschicht sezernieren Glykoproteine und Proteoglykane. Von den Osteoblasten dieser Zone geht das appositionelle Dickenwachstum des Knochens aus.

Beim ausdifferenzierten Knochengewebe geht die Dreischichtigkeit des Periosts verloren. Die Kambiumschicht ist aufgrund ihrer Zellarmut nicht mehr deutlich abzugrenzen. Die dem Knochen anliegende Zone des Periosts enthält beim Erwachsenen nur noch wenige Zellen, die in ihrer Struktur Präosteoblasten gleichen. Diese "ruhenden" oder "inaktiven" Präosteoblasten haben die Potenz sich zu teilen, zu Osteoblasten zu differenzieren und Knochengewebe zu bilden. Die Knochenbruchheilung geht teilweise von den Zellen des Periosts aus.

Die Dicke des Periostschlauches ist unterschiedlich. Sie hängt unter anderem von der Wachstumsintensität des Knochens, vom Alter und von der Lokalisation ab. Die Fibroelastika des Periosts verbindet sich an der Knorpel-Knochen-Grenze der Gelenkflächen mit dem Knorpel und mit der Gelenkkapsel. Am Übergang von knorpeligen und knöchernen Skelettelementen (zum Beispiel an den Rippen) verschmelzen Periost und Perichondrium miteinander. An periostal-diaphysären Sehnenansätzen der Skelettmuskulatur dringen die Kollagenfasern der Sehnen über das Periost in den Knochen ein.

Im Periost liegen die den Knochen ernährenden Gefäße (vasa nutritia). An einigen Stellen (zum Beispiel am Femurhals) verlaufen die Gefäße über eine größere Strecke im Periost, bevor sie in die Kortikalis eindringen und das Knochengewebe versorgen. Knochengefäße und Periostgefäße tragen mit ihrem begleitenden Bindegewebe neben den Sharpeyschen Fasern zur Verankerung des Periosts am Knochen bei.

Das Periost zählt wie der Knochen zu den gut vaskularisierten Geweben. Seine Gefäße bilden entsprechend der Schichtung der Knochenhaut drei Lagen. In der oberflächlichen Adventitia verlaufen größere, meistens von zwei Venen begleitete Arterien, die aus Gefäßen angrenzender Muskeln, Faszien und Sehnen stammen. Die Gefäße bilden kurze Queranastomosen, so dass ein polygonales Maschenwerk wie an anderen Bindegewebsblättern entsteht. Die Aufteilung der terminalen

Strombahn ist örtlich unterschiedlich. Die Kapillaren können netzförmig oder unverzweigt angeordnet sein. Die Kapillaren der mittleren Schicht bilden lang ausgezogene Maschen. Sie erhalten Ihre Blutzufuhr aus der oberflächlichen Zone. Die Gefäße der dritten Schicht liegen unmittelbar an der Grenze zum Knochengewebe. Die Kapillaren bilden Netze, die aus Arterien der Kortikalis gespeist werden. Das Venenblut wird ebenfalls in den Knochen drainiert. Die Knochenhaut enthält außerdem ein dichtes Lymphgefäßnetz [Tillmann (b), 1987; von der Mark und Glückert, 1990; Mow et al., 1991; O'Driscoll et al., 1997].

1.3 Wissenschaftliche Erkenntnisse zum Versuchsvorhaben

Die kausale Behandlung traumatischer und degenerativer Gelenkknorpeldefekte ist aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpelgewebes bisher nicht möglich. Insbesondere bei jüngeren Patienten ist eine Alternative zur endoprothetischen Versorgung gefragt. In der Vergangenheit sind deshalb umfangreiche Studien zum biologischen Gelenkflächenersatz durchgeführt worden. Ein allgemein anerkanntes Verfahren zum biologischen Verschluss von Gelenkflächendefekten gibt es derzeit noch nicht [Mow et al., 1991; Curtin et al., 1992; Hsu et al., 1992; Moran et al., 1992; Messner und Gillquist, 1993; Hartig et al., 1994; Kreder et al., 1994; Noguchi et al., 1994; Ritsilä et al., 1994].

Eine Möglichkeit, Gelenkflächen biologisch zu decken, ist die Verwendung von Periost. Periost besitzt, wenn es vom Knochen gelöst wird, ausgehend von der Kambiumschicht die Potenz, sich zu Knorpel- beziehungsweise Knochengewebe zu differenzieren. Der Prozess der Differenzierung unterliegt molekularen Regulationsmechanismen, die in Ihrer Komplexität noch nicht vollständig bekannt sind [Liu et al., 1994; Wirth et al., 1994]. Es konnte in diesem Zusammenhang experimentell nachgewiesen werden, dass freies, auf osteochondrale Gelenkdefekte transplantiertes Periost hyalinen Knorpel bilden kann [Mow et al., 1991; Curtin et al., 1992; Moran et al., 1992; Hartig et al., 1994; Kreder et al., 1994; Ritsilä et al., 1994; Carranza-Bencano et al., 1999; Orr et al., 1999]. Ob und in welchem Umfang sich Knorpel- oder Knochengewebe bildet, hängt von mehreren Faktoren ab: Zum Beispiel Umgebung und Lagebeziehung des Periosts, Alter des Trans-

plantat spenders beziehungsweise -empfängers oder Lokalisation der Periosttransplantation. Dies war Gegenstand verschiedener Untersuchungen [Takato et al., 1986; Mow et al., 1991; Curtin et al., 1992; Menck et al., 1992; Nagamoto et al., 1993; Kreder et al., 1994; Liu et al., 1994; Wirth et al., 1994].

Die Eigenschaften des neu gebildeten Knorpels unterscheiden sich jedoch qualitativ und quantitativ vom normalen Gelenkknorpel, so dass dieser zwar als möglicher aber wahrscheinlich nicht als vollwertiger Ersatz gelten kann [Mow et al., 1991; Moran et al., 1992; Hartig et al., 1994; Kreder et al., 1994]. Über die Ursache ist gegenwärtig noch wenig bekannt.

Freie Periostlappen wurden bereits erfolgreich klinisch als Ersatz zerstörter Gelenkflächen der Patella [Hoikka et al., 1990], zur Behandlung akuter traumatischer Knorpeldefekte [Korkala und Hukkanen, 1991] und zur Spondylodese bei idiopathischer Skoliose [Snellman et al., 1977] eingesetzt.

Gefäßgestielte Periostlappen wurden sowohl experimentell als auch klinisch zur Überbrückung knöcherner Defekte beziehungsweise zur Behandlung von Pseudarthrosen nach Frakturen erfolgreich eingesetzt [Takato et al., 1986; Crock und Morrison, 1992].

Aus der Literatur sind vergleichende Untersuchungen zur chondrogenetischen Potenz vaskularisierten und freien Periosts bekannt, jedoch nach dem Kenntnisstand des Autors nicht als vergleichende Studie von freien und gefäßgestielten Periostlappen als Gelenkoberflächenersatz. Folgende in tierexperimentellen Studien gewonnene Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auf osteochondrale Gelenkflächendefekte transplantierte, gefäßgestielte Periostlappen eine höhere chondrogenetische Potenz als freie (nicht gefäßgestielte) Periostlappen haben, oder sich zumindest die Qualität des gebildeten Knorpelgewebes unterscheidet:

1. Neovaskularisierte und anschließend frei transplantierte Kaninchenohr-Knorpellappen zeigen Areale aktiver Chondrogenese am Ort der Transplantation [Harase et al., 1988].
2. Vaskularisiertes Perichondrium zeigt im Vergleich zu frei transplantiertem Perichondrium an der Luftröhre (Trachea) eine deutlich umfangreichere Knorpelbildung [Hartig et al., 1994; Naficy und Esclamado, 1997].

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des chondrogenetischen Potenzials von gefäßgestielten Periostlappen im Vergleich zu freien Transplantaten. Diese Lappen werden tierexperimentell als Oberflächenersatz künstlicher osteochondraler Gelenkflächendefekte eingesetzt. Ihre Eignung zur Deckung dieser Defekte durch sich regenerierendes Knorpelgewebe soll untersucht werden. In verschiedenen Untersuchungsmethoden erfolgt eine Einschätzung der Qualität des neugebildeten Gewebes.

Ein tierexperimentelles Modell zum biologischen Gelenkflächenersatz mit gefäßgestielten autogenen Periostlappen wird erarbeitet, um weiterführende Fragestellungen bearbeiten zu können. In vergleichenden Untersuchungen mit freien Periostlappen soll festgestellt werden, ob der durch vaskularisiertes Periost beziehungsweise freies Periost gebildete Knorpel qualitative oder quantitative Unterschiede aufweist. Dazu werden makroskopische, histologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt.

3 Material und Methodik

3.1 Methodisches Vorgehen und Dauer der Einzelversuche

Die Versuche erfolgten in zwei Abschnitten. Zunächst wurde eine Vorversuchsreihe an 9 Tieren vorgenommen und nach deren erfolgreicher Durchführung der Hauptversuch angeschlossen. Das Hauptanliegen des Vorversuchs bestand darin, das geeignete operative Vorgehen zum Gelenkknorpelersatz durch autogenes, mikrovaskulär reanastomosiertes Periost zu finden.

Bei den Tieren handelte es sich um Chinchilla-Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts im Alter von sechs bis acht Monaten und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 3600 ± 108 Gramm. Vor Operationsbeginn wurde der Epiphysenfugenverschluss zur Dokumentation des abgeschlossenen Knochenwachstums anhand eines Röntgenbildes überprüft. Die Tiere wurden in standardisierten Käfigen gehalten, erhielten standardisiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum und wurden bei 50 bis 60% relativer Luftfeuchtigkeit unter einem Lichtregime von jeweils zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit gehalten, wobei die Lichtzeit 06.00 Uhr begann und 18.00 Uhr endete.

3.2 Versuchsablauf

Die operativen Eingriffe erfolgten unter Allgemeinanästhesie. Diese wurde durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin (50mg/kg Körpergewicht) und Rompun TS (4mg/kg Körpergewicht) eingeleitet und dann durch intravenöse Applikation derselben Medikamente (8,3 mg/kg Körpergewicht Ketamin + 0,417 mg/kg Körpergewicht Rompun TS als intravenöses Gemisch alle 10-40 Minuten) in eine prominente Ohrvene aufrechterhalten.

Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Rasur des zu operierenden rechten Hinterlaufes von Ober- und Unterschenkel. Nach dreimaliger Desinfektion und steriler Abdeckung erfolgte die Operation unter sterilen Bedingungen. Durch

einen längsverlaufenden Hautschnitt über dem Kniegelenk wurde die Patella dargestellt. Die Eröffnung des Kniegelenks erfolgte durch parapatellare Inzision des Retinakulums sowie der Synovialis. Zur Darstellung des femoralen Gleitlagers der Patella wurde diese nach lateral luxiert. Durch Osteotomie wurde dort ein definierter Knochen-Knorpeldefekt von sechs mal vier Millimeter Größe geschaffen, der im Anschluss zu decken war. Der zu transplantierende gefäßgestielte beziehungsweise freie Periostlappen wurde präpariert, gehoben und auf den Gelenkflächendefekt transplantiert.

In der Durchführung dieses Operationsschrittes unterscheiden sich die zu untersuchenden Versuchsgruppen.

3.2.1 Gruppeneinteilung Vorversuch

Im Vorversuch werden drei Gruppen gebildet: Gruppe 1 mit vier Tieren, Gruppe 2 mit zwei Tieren und Gruppe 3 mit drei Tieren. Das zweite Kniegelenk eines jeden Tieres dient als Kontrolle.

Gruppe 1: Es wird am rechten Bein ein ca. ein mal ein Zentimeter großer, gefäßgestielter Periostlappen vom medialen Bereich des Femurs, der von einem Ast der arteria und vena femoralis, der arteria beziehungsweise vena genus superior, versorgt wird, gehoben und invertiert, d.h. mit der Kambiumschicht zum Gelenkinneren orientiert und in dem osteochondralen Defekt mit Fibrinkleber fixiert. Die Lappen erhält man durch scharfe Präparation. Dadurch wird vermieden, dass die Kambiumzellschicht am Knochen verbleibt.

Der Gefäßstiel des Periostlappens wird unter Ligatur aller anderen abgehenden Gefäße einschließlich doppelter Ligatur und Durchtrennung der arteria und vena femoralis distal des Abgangs der arteria beziehungsweise vena genus superior präpariert. Die ausreichende Blutversorgung des Beins nach Unterbindung der femoralen Gefäße ist durch bestehende Kollateralen gewährleistet. Der Gefäßstiel des Lappens entspringt direkt an den femoralen Gefäßen, diese werden nun durchtrennt und anschließend mikrochirurgisch reanastomosiert. Als Nahtmaterial für

die Gefäßanastomosen dient Ethilon 10-0. Dabei fungiert ein ca. ein Zentimeter langes, distal des Gefäßstielabgangs gelegenes Gefäßbündel als Interponat.

Gruppe 2: Es wird am rechten Bein ein gefäßgestielter Periostlappen vom proximalen, medialen Bereich der Tibia gehoben, invertiert und ohne mikrochirurgische Reanastomosierung in den geschaffenen osteochondralen Defekt transplantiert.

Gruppe 3: Bei dieser Gruppe wird von derselben Entnahmestelle am rechten Bein ein freier, also nicht gefäßgestielter Periostlappen gehoben und in den Defekt transplantiert.

Im Anschluss an die jeweils durchgeführte Operation wird an den Kniegelenken der Gegenseite bis zur Eröffnung der Gelenkkapsel gleichermaßen vorgegangen. Es folgen ein schichtweiser Wundverschluss, Betaisodona-Touchierung und ein steriler Verband. Die Kniegelenke der Gegenseite dienen in dieser Untersuchung als Kontrollgruppe. Es ergeben sich Operationszeiten von zwei bis vier Stunden bei den mikrochirurgischen Operationen und von etwa einer Stunde bei den übrigen Operationen.

3.2.2 Gruppeneinteilung des Hauptversuchs

Der Hauptversuch erfolgt nach erfolgreichem Abschluss der Vorversuche an insgesamt 19 Tieren, welche in drei Gruppen eingeteilt werden.

Tabelle eins: Gruppeneinteilung des Hauptversuchs.

Gruppe:	Charakteristikum:	Tieranzahl:
1	Kontrollen	19
2	freie Transplantate	8
3	gefäßgestielte Transplantate	11

Gruppe 1 wird aus allen Tieren gebildet, bei der die linken Kniegelenke der Tiere der gleichen Operationsprozedur wie in den Transplantatgruppen unterzogen werden, jedoch ohne Entnahme von Knorpelgewebe und ohne Transplantatversorgung. Die Tiere der Gruppe 2 erhalten am gegenseitigen Kniegelenk freie Transplantate wie die in Gruppe 3 des Vorversuchs. Die osteochondralen Gelenkflächendefekte der Tiere in Gruppe 3 werden mit gefäßgestielten und mikrochirurgisch reanastomosierten Periostlappen wie in Gruppe 1 des Vorversuchs beschrieben, versorgt.

3.2.3 Postoperative Beobachtungsphase

Nach den Operationen werden die Tiere für sechs Monate bei normaler Käfigaktivität gehalten.

Postoperativ ist bei allen Tieren ein üblicher Wundschmerz zu erwarten, der bei normaler Wundheilung wenige Tage anhalten wird. Aus diesem Grund wird für den Zeitraum von drei Tagen eine Analgesie durchgeführt. (Temgesic 0,02 bis 0,05 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht als subkutane Injektion alle acht bis zwölf Stunden).

Nach Abschluss der Wundheilung, das heißt nach etwa sieben bis zehn Tagen, ist nur noch gelegentlich mit geringen Schmerzen zu rechnen. Für den übrigen Beobachtungszeitraum werden dann voraussichtlich keine Schmerzen mehr auftreten.

An Komplikationsmöglichkeiten sind insbesondere Infektionen beziehungsweise Abszesse zu befürchten. Aus diesem Grunde wird die perioperative Infektionsprophylaxe durchgeführt (Antibiotikum Gentamicin zweimal täglich ein Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht als subkutane Injektion bis zum fünften postoperativen Tag).

Nach Abschluss der Beobachtungsperiode werden die Tiere zur Entnahme und Aufarbeitung der operierten Kniegelenke geopfert. In der Gruppe der gefäßgestielten Transplantate erfolgt vorher in Narkose die Darstellung des Gefäßstiels zur Überprüfung der Durchgängigkeit anhand sichtbarer Pulsationen.

Die Opferung erfolgt durch Injektion von fünf Milliliter einer T 61 Injektionslösung (Fa. Hoechst Veterinär GmbH) in eine prominente Ohrvene.

Wie bereits beschrieben erfolgt Rasur, Eröffnung des Kniegelenkes und Darstellung des femoropatellaren Gleitlagers. Nach Ablösung aller mit dem Knochen fest verwachsenen Bänder und Weichteile vom distalen Femur mit Hilfe eines Raspatoriums, wird dieses proximal der Facies patellaris in der Horizontalebene abgesetzt. Vor der Fixierung in 4,5% gepuffertem und säurefreiem Formalin (Fa. Roth) werden alle Knorpel-Knochenpräparate der femoropatellaren Gleitlager makroskopisch beurteilt, fotografiert und ein Teil des regenerierten Knorpelgewebes für biochemische Analysen folgendermaßen entnommen:

Im proximalen Anteil des neugebildeten Gewebes wird mit Hilfe einer Stanze ein definiertes Gewebestück von drei mal drei Millimeter ausgestanzt, mit einem Raspatorium vom Knochen abgelöst, in ein verschließbares Gefäß (Fa. Eppendorf) überführt und bei -20°C gelagert.

Die entnommenen Kniegelenke werden makroskopisch, histologisch und biochemisch aufgearbeitet und entsprechend ausgewertet.

3.3 Biochemische Analyse

In der biochemischen Analyse wird von den entnommenen Gewebestücken der Wassergehalt bestimmt und eine quantitative Gesamtkollagenbestimmung durchgeführt.

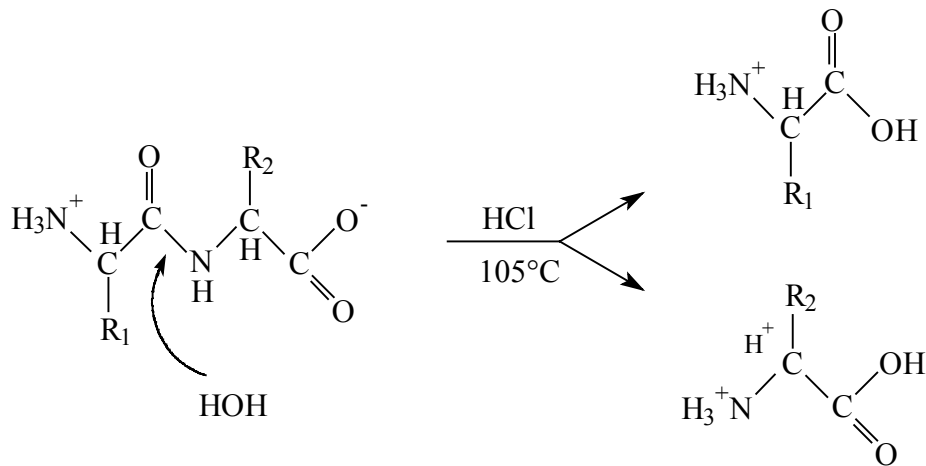
3.3.1 Wassergehalt der Gewebeproben

Zunächst wird das Feuchtgewicht der Knorpelproben ermittelt. Die anschließende Gewebetrocknung der Proben erfolgt unter Vakuum mit Phospho-V-oxid im Exsikkator. Die Proben werden täglich erneut gewogen, bis sich das Gewicht an zwei aufeinanderfolgenden Tagen nicht mehr ändert. Der prozentuale Wassergehalt der entnommenen Knorpelproben wird bestimmt.

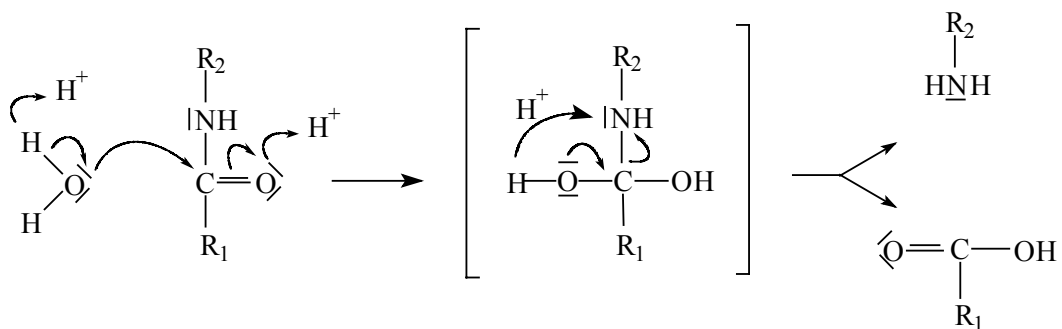
3.3.2 Säurehydrolyse von organischem Material

Durch Säurehydrolyse ist es möglich den Hydroxyprolinegehalt von organischen Gewebeproben zu bestimmen und den Gesamtkollagengehalt zu errechnen. Der Hydroxyprolinegehalt wird nach dem Verfahren von Woessner in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stalder ermittelt, da sich diese Methode dann auch für Proben mit niedrigem Hydroxyprolinegehalt eignet [Woessner, 1961; Stegemann und Stalder, 1967]. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Kollagenbestimmung in Proteinhydrolysaten.

In Anwesenheit von halbkonzentrierter Salzsäure (6 mol/l) wird die Peptidbindung bei hohen Temperaturen (105°C) hydrolytisch gespalten.

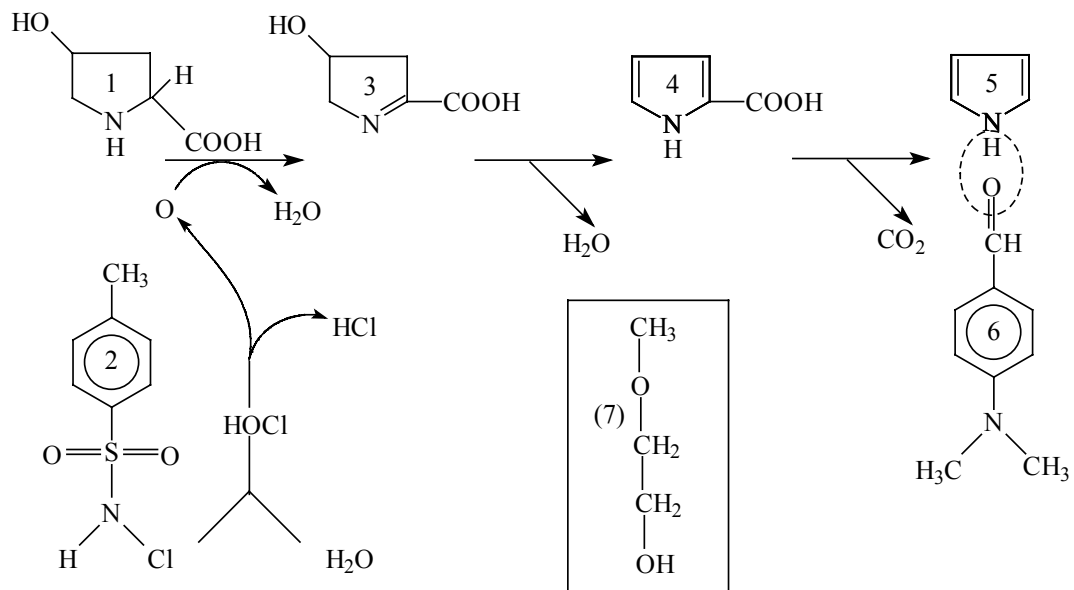


Der Reaktionsmechanismus läuft nach folgendem Schema ab:



Nach Abschluß der Hydrolyse wird das Hydrolysat mit Natronlauge neutralisiert und mit einem Citratpuffer auf pH 5,4 bis 6,0 eingestellt. Anschließend kann Hydroxyprolin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nachgewiesen werden [Woessner, 1961]:

Hydroxyprolin (1) wird durch Chloramin T (2) schrittweise über Pyrrolincarboxylsäure (3) und Pyrrol-2-Carbonsäure (4) zu Pyrrol (5) oxidiert.



Pyrrol (5) bildet zusammen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (6) ein Chromophor, welches ein Absorptionsmaximum bei 565 nm hat. Als Lösungsvermittler für Chloramin T und p-Dimethylaminobenzaldehyd dient Methylcellosolve (7). (Methylcellosolve entspricht Ethylenglykolmonoethylether).

Reagenzien:

- a.) HCl (6 mol/l)
- b.) Citrat/Acetat-Puffer mit pH=6. Herstellung: 50g Citronensäure x H₂O; 12 ml Eisessig; 120g Natriumacetat x 3 H₂O; 34g NaOH; H₂O ad 1 l.
- c.) NaOH (2,2g%) - Citrat/Acetat-Puffer

d.) Chloramin-T-Reagens. Herstellung: 1,41g Chloramin T + 20 ml H₂O + 30 ml Methylcellosolve + 50 ml Citrat/Acetat-Puffer (pH=6); täglich frisch hergestellt.

e.) Perchlorsäure (6,2 mol/l)

f.) p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung. Herstellung: 10g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 50ml Methylcellosolve lösen; jeweils frisch hergestellt.

g.) Hydroxyprolin-Standard: Stammlösung: Hyp 1 mg/ml H₂O gelöst und portioniert bei -20°C aufbewahrt.

h.) Gebrauchslösung: Hyp (5µg/ml). Herstellung: 50µl Stammlösung auf 10 ml Citrat/Acetat-Puffer.

Es folgt die Darstellung zur Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration in den hydrolysierten Proben und die Berechnung des Kollagenanteils im Untersuchungsmaterial.

3.3.3 Versuchsdurchführung

1.) Hydrolyse des organischen Materials:

Einwaage des Untersuchungsmaterials in ein Hydrolyserohr

Zugabe von 0,5 ml HCl (6 mol/l)

Zuschmelzen des Hydrolyserohrs

Hydrolyse über 24h bei 105°C im Thermostat

2.) Probenvorbereitung:

Öffnen der Hydrolyse-Ampulle

Entnahme des Hydrolysats

Neutralisation von 0,05 ml Hydrolysats mit 0,45 ml NaOH-Citrat/Acetat-Puffer (End-pH-Wert: 5,4) = 0,5 ml Hydrolysats-Verdünnung (1:10)

Verdünnung der Proben 1:20 mit Citrat/Acetat-Puffer: 250 µl Hydrolysats-Verdünnung (1:10) + 4,75 ml Citrat/Acetat-Puffer (Endverdünnung 1:200).

3.) Hydroxyprolin-Bestimmung:

Jeder Test umfasst die Bestimmung von:

- a.) Leerwert des Citrat/Acetat-Puffers
- b.) Standard (Hydroxyprolin-Gebrauchslösung)
- c.) Probe (Hydrolysatverdünnung 1:200)

1,0 ml Untersuchungslösung a.) ; b.) ; c.)

mit 0,5 ml Chloramin-T-Reagens versetzen, schütteln und 20 min bei 22°C stehen lassen.

Zu diesem Ansatz 0,5 ml Perchlorsäure (6,2 mol/l) hinzufügen, schütteln und weitere 12 min bei 22°C stehen lassen.

Anschließend 0,5 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd hinzufügen, schütteln und bei 60°C für 20 min inkubieren.

Die Messung der Lichtabsorption bei 565 nm erfolgt innerhalb einer Stunde.

4.) Auswertung:

Die Berechnung des Hydroxyprolinanteils in der Hydrolysatverdünnung wird anhand der folgenden Rechenschritte ermittelt: Zunächst wird die Hydroxyprolinkonzentration in den Proben mit der folgenden Formel bestimmt: $c(\text{Probe}) = (\Delta E(\text{Probe}) \cdot 5) / \Delta E(\text{Standard})$ [$\mu\text{g/ml}$]. Im Anschluss wird die Masse des Hydroxyprolins in den Proben mit folgender Formel ermittelt: $m(\text{Probe}) = c(\text{Probe}) \cdot 0,1$ [mg]. Daraus errechnet sich die Masse des Kollagenanteils folgendermaßen: $m(\text{Kollagen}) = (m(\text{Probe}) \cdot 100) / 12,5$ [mg]. Der prozentuale Kollagenanteil ergibt sich wie folgt: Kollagenanteil (Probe) in % = $(m(\text{Kollagen}) \cdot 100) / m(\text{Probe})$. Die Berechnung erfolgt nach den Angaben von Stegemann und Stalder, [1967].

3.3.4 Eichkurve:

Der lineare Zusammenhang von Konzentration und Extinktion zur Hydroxyprolinbestimmung mittels spektrofotometrischer Messung wird anhand einer Eichkurve dargestellt. Die Extinktion von Proben einer definierten Verdünnungsreihe wird in Dreifachbestimmungen, wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben, gemessen.

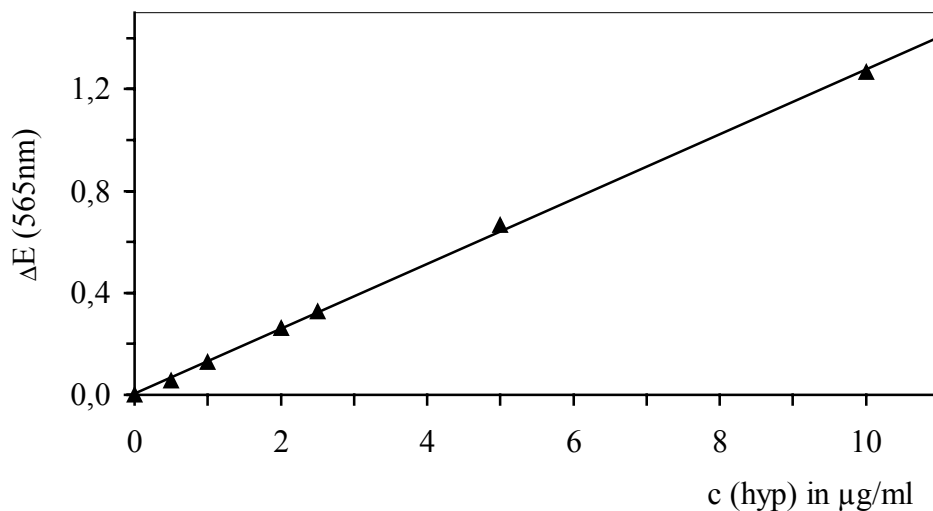


Abbildung eins: Darstellung des Zusammenhangs von Konzentration c und Extinktion ΔE bei einer definiert verdünnten Hydroxyprolinlösung.

3.4 Qualitätskontrolle des Verfahrens

Neben den Originalproben werden als Qualitätskontrolle zusätzliche Verdünnungsreihen gemessen.

Der Einfluss potentieller Störfaktoren auf die Hydroxyprolinbestimmung wird ermittelt; die Vollständigkeit der unter Punkt 3.3.2 beschriebenen "Hydrolyse des organischen Materials" wird im Zeitvergleich bestimmt. Außerdem wird der Einfluss hoher und niedriger Temperatur auf die Aminosäurebestimmung überprüft.

3.4.1 Einfluss potentieller Störfaktoren

Bei den Faktoren die diese Analyse beeinflussen, könnte es sich sowohl um zelluläre Bestandteile als auch um Teile der extrazellulären Matrix handeln (zum Beispiel Kollagenfibrillen, Hyaluronsäure und Proteoglykane).

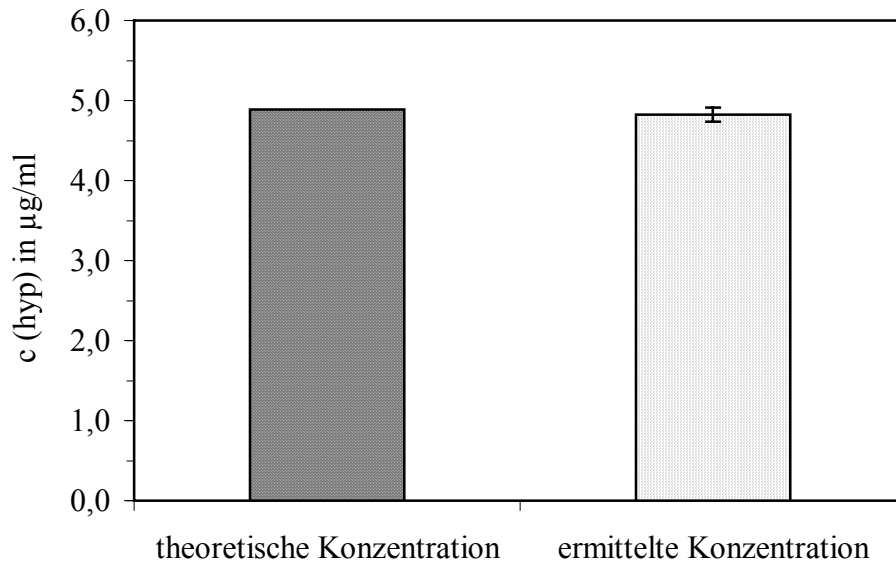


Abbildung zwei: Nachweis des Einflusses von Störfaktoren auf die Konzentrationsbestimmung in Hydroxyprolinhydrolysaten aus Knorpelregeneraten von Kaninchenkniegelenken.

Der Einfluss potentieller Störfaktoren auf die Analyse lässt sich durch Zugabe einer definierten Hydroxyprolinmenge zu den Originalproben feststellen. Anschließend wird der Gesamtgehalt an Hydroxyprolin, der sich idealerweise aus dem ursprünglichen und zugesetzten Hydroxyprolingehalt addiert, in der Probe bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass es sich um einen linearen Zusammenhang zwischen der Hydroxyprolinkonzentration und gemessener Extinktion handelt, sind sämtliche Abweichungen von dem theoretisch zu erwartenden Hydroxyprolingesamtgehalt auf die o.a. Störfaktoren zurückzuführen.

Es werden sechs Gewebeprobe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Nach der unter Punkt 3.3.2 beschriebenen Hydrolyse und Vorbereitung der Proben, versetzt

man die Proben mit 15 μl einer Hydroxyprolin-Stammlösung der Konzentration $c=1 \mu\text{g/ml}$ und bestimmt den Hydroxyprolin-Gesamtgehalt in Dreifachbestimmungen. Für die errechnete Konzentration ergibt sich ein Wert von $c=4,891 \mu\text{g/ml}$, für die gemessene ein Mittelwert von $c=4,828 \mu\text{g/ml} \pm 0,09$ (Meßwerte siehe Anlagen).

3.4.2 Hydrolyse im Zeitvergleich, Langzeitversuch

Um die Vollständigkeit der Hydrolysereaktion zu überprüfen, werden sechs Versuchsansätze der unter Punkt 3.3.3 beschriebenen Säurehydrolyse bei 104°C unterzogen. Dabei besteht jeder Ansatz aus drei Einzelproben.

Die Reaktion wird nach definierten Zeitintervallen unterbrochen und die aus dem Kollagen freigesetzte Menge an Hydroxyprolin bestimmt. Als Untersuchungsmaterial dient lyophilisiertes, getrocknetes Rattenschwanzkollagen.

Obwohl die Reaktion nach zwölf Stunden vollständig abgelaufen ist (siehe Abbildung drei), wird im weiteren Vorgehen das Zeitintervall von 24 Stunden beibehalten.

Tabelle zwei: Inkubationsdauer der einzelnen organischen Gewebeproben

Versuchsansatz:	Inkubiert für:
1	72 Stunden
2	48 Stunden
3	24 Stunden
4	12 Stunden
5	6 Stunden
6	1 Stunde

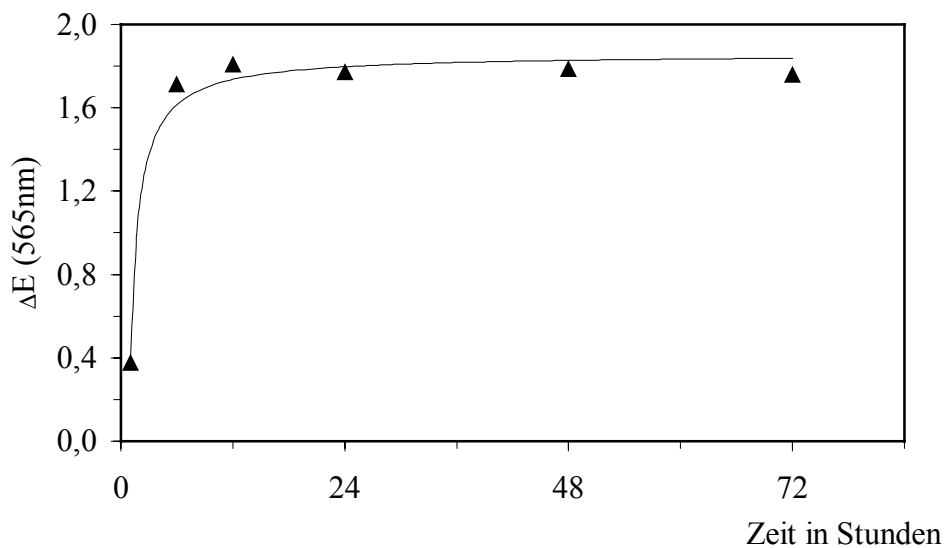


Abbildung drei: Untersuchung des Zeitintervalls für eine vollständige Hydrolysereaktion von organischen Gewebeproben.

3.4.3 Temperatureinfluss auf die Hydroxyprolinbestimmung

Der Einfluss der unter Punkt 3.2.2 beschriebenen Säurehydrolyse sowie der hohen Temperatur im Inkubationsofen auf die Hydroxyprolinbestimmung wird untersucht. Dazu wird eine Lösung von zehn Milligramm Hydroxyprolin in zehn Milliliter Aqua destillata hergestellt [$c(\text{hyp})=1 \text{ mg/ml}$]. Diese Konzentration ist durch spätere Verdünnungen bei der Analyse mit den Originalproben vergleichbar (Messwerte siehe Anlagen).

Vier Proben zu je ein Milliliter werden mit 0,5 ml HCl (6 mol/l) versetzt und für 24 h bei 104°C inkubiert (Gruppe 1, Probe 1 bis 4). Zusätzlich werden weitere vier Proben zu je einem Milliliter bei -20°C für 24 h gelagert um den störenden Einfluß niedriger Temperaturen auszuschließen (Gruppe 2, Probe fünf bis acht). Anschließend werden alle Proben der oben beschriebenen "Probenvorbereitung" und "Hydroxyprolinbestimmung" in Dreifachbestimmungen unterzogen.

Für den unbehandelten Standard ergibt sich ein Mittelwert für die gemessene Extinktion von $\Delta E=0,538$, die Standardabweichung beträgt 0,005, der Extinktions-

mittelwert der auf 104°C erhitzten Proben beträgt $\Delta E=0,541$ (Standardabweichung 0,004) und in der Gruppe der auf -20°C abgekühlten Proben wird ein Wert von $\Delta E=0,542$ und eine Standardabweichung von 0,009 ermittelt. Zur Ergebnisdarstellung siehe Abbildung vier.

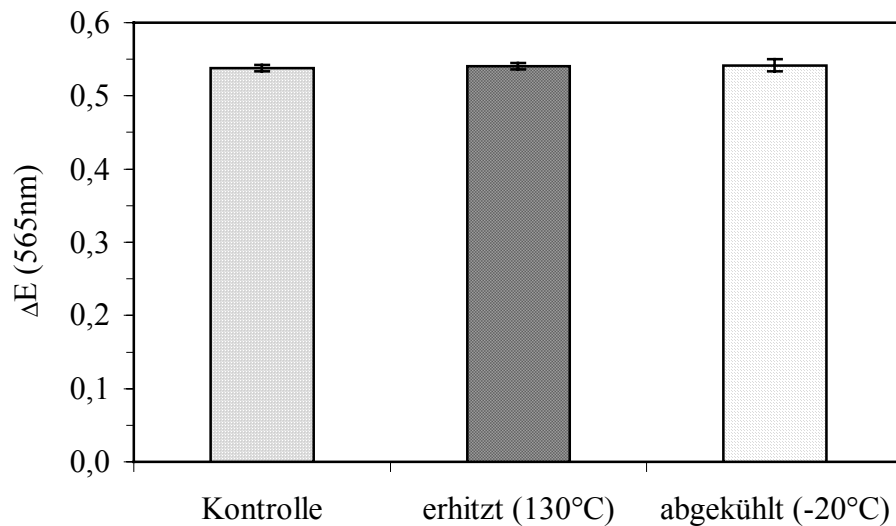


Abbildung vier: Darstellung des Temperatureinflusses auf die Hydroxyprolinbestimmung in Proteinhydrolysaten von Regenerationsgewebe aus Kaninchenkniegelenken.

3.5 Makroskopische Untersuchung

Bei allen Kaninchen wird nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten die aktive und passive Beweglichkeit getestet und das Vorliegen eines Gelenkergusses kontrolliert. Die Kontrolle der aktiven Bewegung erfolgt durch Beobachtung der Tiere im Stand und in der Fortbewegung. Bei der passiven Funktionsprüfung wird während des Extensions- und Flexionsvorgangs besonderes auf Krepitationen geachtet.

In Gruppe 3 wird in Narkose das Kniegelenk entlang der ursprünglichen Operationsnarbe nach Rasur unter aseptischen Bedingungen eröffnet, die Gefäßanasto-

mose dargestellt und die Durchgängigkeit visuell anhand sichtbarer Pulsationen überprüft. Für Gruppe 1 und 2 entfällt dieser Operationsschritt.

Die Operierung erfolgt durch Injektion von T-61 analog zur Durchführung im Vorversuch.

3.5.1 Makroskopisches Bewertungsschema

Nach Eröffnung der Gelenkkapsel wird der Defektbereich hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit (glatt, rau, Randspalten), der Farbe (weiß, grau), der Niveauunterschiede zwischen Gelenkknorpel und Regenerat, der Konsistenz des Ersatzgewebes im Vergleich zum umgebenden Knorpelgewebe, der Untergrundhaftung des Regenerats und der Rekonstruktion des gesamten femoropatellaren Gleitlagers beurteilt.

Zusätzlich werden degenerative Veränderungen des Umgebungsknorpels erfasst. Alle makroskopischen Ergebnisse werden fotografisch dokumentiert. Die Auswertung wird anhand des folgenden Bewertungsschemas in Anlehnung an O'Driscoll (1988) vorgenommen.

Makroskopische Bewertung der Gelenkoberflächen (maximal 4 Punkte)

- 4 Punkte spiegelnd glatte Oberfläche, weiße Farbe, Gewebe liegt im Niveau des Umgebungsknorpels, keine Randspaltenbildung nachweisbar, eine dem Umgebungsknorpel entsprechende Konsistenz.
- 3 Punkte angedeutete Unregelmäßigkeiten der Oberfläche und leichte Konsistenzminderung, sonst wie oben.
- 2 Punkte mäßige Unebenheiten der Oberfläche, geringgradig über oder unter dem Niveau des Umgebungsknorpels, mäßige Konsistenzminderung, angedeutete Randspalten.
- 0 Punkte bei schlechteren Verhältnissen werden keine Punkte vergeben.

3.6 Histologische Untersuchungen

Die entnommenen und in 4,5% gepuffertem und säurefreiem Formalin (Fa. Roth) fixierten Präparate werden entkalkt. Dies geschieht nach dem folgenden Arbeitsverfahren:

Entkalkung für 48 Stunden in Ameisensäure (10%) und anschließendem Verbleib der Präparate in Ethylendiaminessäure (=EDTA) folgender Zusammensetzung:

700 g Chelaplex

+4800 ml Aqua destillata

+65 g NaOH

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Nach 9 Tagen werden die Präparate auf vollständige Entkalkung überprüft und je nach Grad der Entkalkung für weitere 24 h in dieser Lösung belassen. Das gewählte Verfahren ist sehr schonend.

Anschließend werden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe über Ethanol (50% → 60% → 70% → 80% → 96%), Isopropanol, Methylbenzoat sowie Toluol entwässert und in Paraffin eingebettet. Von jedem erhaltenen Paraffinblock werden mindestens 5 Schnitte von je 7µm Schichtdicke angefertigt. Die Schnittebene liegt horizontal zur Körperebene, somit kann eine Beurteilung der Defektränder, des Defektbodens und der Schichtdicke des Regenerats erfolgen.

3.6.1 Darstellung der Färbungen

Folgende Färbungen finden Anwendung:

a.) Azan-Färbung nach Heidenhain

Die Azanfärbung ist eine klassische Bindegewebsfärbung, in der die Zellkerne rot dargestellt werden. Kollagen, Basalmembran und Mucin wird blau dargestellt.

b.) Safranin O-Färbung zur selektiven Darstellung der Glykosaminoglykane des Knorpelgewebes. Hierbei handelt es sich um eine histologische Standardfärbung. Der kationische Farbstoff bindet sich an die reaktiven Karboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Glykosaminoglykane der Knorpelmatrix und es erfolgt eine stöchiometrische Umsetzung des Farbstoffes mit den Polyanionen. Die Farbintensität ist direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt des Gewebes.

Das Safranin-O wird in seine orthochrome Form transferiert, das heißt, es bindet sich nur an die Gewebepolyanionen und nicht an das Kollagen. Die Färbung mit Safranin-O kann als semiquantitative histochemische Methode für die Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im Knorpelgewebe angesehen werden [von der Mark und Glückert, 1990].

3.6.2 Azan-Färbung nach Heidenhain

Herstellen der Lösungen:

Azokarmin: 0,1 g Azokarmin in 100 ml Aqua bidestillata aufschwämmen; kurz kochen lassen; abkühlen; filtrieren; zu 100 ml Filtrat 1 ml Eisessig

Anilin-Alkohol: 1 ml Anilinöl in 1000 ml 96%igem Alkohol gelöst

Essigsaurer Alkohol: 1 ml Eisessig auf 100 ml 96%igen Alkohol

Anilinblau-Orange: 0,5 g wasserlösliches Anilinblau und 2 g Goldorange in 100 ml Aqua bidestillata gelöst; 8 ml Eisessig hinzusetzen; aufkochen; abkühlen lassen; filtrieren; Stammlösung 1:3 verdünnen mit Aqua bidestillata

Durchführung:

- 1.) Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe über Xylol, Isopropanol und Ethanol (96% → 80% → 70% → 60%) entparaffinieren.
- 2.) Kernfärbung der Schnitte mit Azokarmin für 15 Minuten bei 56°C im Brutschrank
- 3.) Abkühlen der Schnitte auf Zimmertemperatur.
- 4.) Spülen der Schnitte mit Aqua bidestillata.

- 5.) Differenzieren der Schnitte in 1%igem Anilin-Alkohol, bis die Zellkerne deutlich hervortreten.
- 6.) Kurzes Waschen der Schnitte in essigsaurem Alkohol.
- 7.) Beizen des Bindegewebes in 5%iger Phosphorwolframsäure für 30 Minuten.
- 8.) Spülen der Schnitte in Aqua bidestillata.
- 9.) Färben des Bindegewebes mit Anilinblau-Orange-Gemisch für 30 Minuten.
- 10.) Differenzieren der Schnitte in 96%igen Alkohol.
- 11.) Abtrocknen der Schnitte.
- 12.) Eindecken mit Canada Balsam.

3.6.3 Safranin O-Färbung

Herstellen der Lösung:

- a.) 6 g eines wasserlöslichen Safranin-O-Farbstoffs in 100 ml 0,03 m HCl bei 50°C lösen, heiß filtrieren; dem Filtrat 10 ml HCl (37%, rauchend) über 10 Minuten langsam zugeben und warten, bis das Filtrat auf 5°C abgekühlt ist
- b.) Filtrat zentrifugieren, Überstand verwerfen, mit Ethanol und danach mit Ether waschen, trocknen
- c.) von diesen Kristallen 0,1 g in 100 ml Aqua bidestillata lösen

Durchführung:

- 1.) Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe über Xylol, Isopropanol und Ethanol (96% → 80% → 70% → 60%) entparaffinieren.
- 2.) Schnitte in 0,1%ige Lösung Safranin O für 6 Minuten
- 3.) Abspülen des freien Farbstoffes in Aqua bidestillata
- 4.) Schnitte in 96%igen Alkohol schwenken
- 5.) Schnitte in 100%igen Alkohol schwenken
- 6.) Abtrocknen der Schnitte

7.) Schnitte in Xylol waschen

8.) Eindecken in Canada Balsam

3.6.4 Histologisches Bewertungsschema

Die histologische Bewertung erfolgte in Anlehnung an O'Driscoll et al. 1988. Das vorherrschende Gewebe im ehemaligen Defektbereich besitzt den höchsten Stellenwert in der Beurteilung.

Die Unterteilung der Gewebe erfolgt in fibröses Gewebe oder Knochen, inkomplett differenziertes Gewebe und hyalinähnlichen Knorpel ohne oder mit typischer Schichtung. Weiterhin wird das Färbeverhalten der Matrix in eine normale oder annähernd normale Anfärbbarkeit, eine leicht beziehungsweise stark verminderte Anfärbbarkeit und einen völligen Färbungsverlust eingeteilt. Von hyalinähnlichem Knorpel wird gesprochen, wenn eine normale Anfärbung der Matrix mit Safranin-O vorliegt und sich die Chondrozyten mit typischem runden bis ovalen Zellkern in Lakunen darstellen. Eine diskrete Hyperzellularität und eine atypische zonale Gliederung wird toleriert.

Die strukturelle Beschaffenheit des Regenerats bildet ein weiteres Kriterium. Es wird unterschieden zwischen einer glatten und intakten Oberfläche, oberflächlichen Laminationen, Fissuren bis 25% der Schichtdicke und schweren Spaltbildungen einschließlich Fibrillationen. Die Beziehung zum umliegenden Gewebe im Sinne einer strukturellen Integrität wird durch Prüfung auf eventuell vorhandene Spaltbildungen beurteilt. Die Schichtdicke des Ersatzgewebes im Vergleich zum vorhandenen Gelenkknorpel wird prozentual auf das Erreichen der Gelenkoberfläche bezogen.

Die zellulären Veränderungen werden mit normalem Gelenkknorpel hinsichtlich der Zellzahl und der Bildung von Chondrozytenclustern verglichen.

Degenerative Veränderungen des umgebenden Knorpelgewebes werden auf Ihre Anfärbbarkeit mit Safranin-O, Clusterbildung und die Zellularität hin untersucht.

Im Score können maximal 24 Punkte erreicht werden. Diese summieren sich aus den einzelnen Punktwerten innerhalb der mikroskopischen Bewertung des im

Defekt gebildeten Gewebes (21 Punkte) und der mikroskopischen Bewertung des Umgebungsknorpels (3 Punkte).

Histologisch-histochemische Bewertung der Gelenkflächen (maximal 21 Punkte):

Art des prädominierenden Gewebes im Defekt (maximal 7 Punkte):

a.) Histomorphologisch:

4 Punkte hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung

3 Punkte hyalinähnlicher Knorpel ohne typische Schichtung

2 Punkte inkomplett differenziertes mesenchymales Gewebe

0 Punkte fibröses Gewebe oder Knochen

b.) Safranin-O-Färbung der Matrix:

3 Punkte normale oder annähernd normale Anfärbbarkeit

2 Punkte leicht verminderte Anfärbbarkeit

1 Punkt stark verminderte Anfärbbarkeit

0 Punkte keine Anfärbung

Strukturelle Charakteristika des neugebildeten Gewebes (maximal 9 Punkte):

a.) Oberflächenbeschaffenheit:

3 Punkte glatt und intakt

2 Punkte oberflächliche, horizontale Lamination

1 Punkt Fissuren bis 25% der Schichtdicke

0 Punkte schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen

b.) Strukturelle Integrität:

2 Punkte normal

1 Punkt leichte Spalten und/oder Zysten

0 Punkte schwere Desintegration

c.) Schichtdicke im Vergleich zum Oberflächenniveau des Umgebungsknorpels:

2 Punkte vollständiger Ersatz in voller Höhe

1 Punkt Ersatzgewebe von mehr als 50% der Gesamthöhe

0 Punkte Ersatzgewebe von weniger als 50% der Gesamthöhe

d.) Bindung zum Umgebungsknorpel:

2 Punkte komplett an beiden Seiten

1 Punkt komplett an einer Seite oder partiell an beiden Seiten

0 Punkte keine Bindung

Zelluläre Veränderungen im neugebildeten Gewebe (maximal 5 Punkte):

a.) Zellzahl:

3 Punkte normal

2 Punkte leichte Hypo- oder Hyperzellularität

1 Punkt mäßige Hypozellularität

0 Punkte schwerste Hypo- oder Azellularität

b.) Chondrozytencluster:

2 Punkte keine

1 Punkt weniger als 25% der Zellen

0 Punkte mehr als 25% der Zellen

Degenerative Veränderungen im Umgebungsknorpel (maximal 3 Punkte):

3 Punkte normale Zellularität, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit mit Safranin-O

2 Punkte normale Zellularität, wenige Cluster, mäßiger Färbbarkeitsverlust

1 Punkt leichte bis mäßige Hypozellularität, viele Cluster, geringe Anfärbbarkeit

0 Punkte schwerste Hypo- bis Azellularität, keine Anfärbbarkeit mit Safranin-O

3.7 Chemikalien, Geräte und Medikamente

Rompun TS ist von Bayer Vital GmbH & Co. KG, Leverkusen, Deutschland. T 61 Injektionslösung von Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim, Deutschland. Ketamin und Gentamycin sind von der Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland. Temgesic Injektionslösung stammt von Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland. Tissucol Duo S Gewebekleber ist ein Produkt von Baxter Deutschland GmbH Hyland-Immuno Division, Heidelberg, Deutschland und Betaisodona-Lösung von Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland.

Die Nahtmaterialien Ethilon 10-0 und Prolene 5-0 stammen von Ethicon, Norderstedt, Deutschland.

Das Photometer "Spekol" wird von der Firma Carl Zeiss Jena in Deutschland hergestellt.

Bei dem verwendeten Kamerasystem handelt es sich um eine Leica M4 in Verbindung mit einem Visoflex 2, Balgengerät 2 und dem Objektiv Elmarit 1:2,8 f=90 mm. Alle Fotografischen Geräte kommen aus dem Hause Ernst Leitz, Wetzlar, Deutschland. Sämtliche Chemikalien und Gefäße werden bei Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA bestellt. Alle Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.a..

3.8 Mathematische und statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse und Darstellung der Ergebnisse werden Microsoft Excel 2000 in Verbindung mit dem Zusatzprogramm Win-Stat und Microsoft Word 2000, beide für Windows 2000, verwendet. Ergebnisse werden als signifikant betrachtet, wenn sich bei der statistischen Analyse eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ergibt ($p < 0,05$). Sämtliche Ergebnisse werden, wenn nicht gesondert angeführt, als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des Vorversuchs

Tabelle drei: Übersicht zur Operationstechnik und der Durchgängigkeit der Gefäßanastomosen im Vorversuch.

Tier	Operations- technik	Anastomose post operationem	Anastomose bei Versuchsende	Bemerkungen
1	freies Transplantat	entfällt	entfällt	
2	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsationen sichtbar	∅	Verstorben am 2. Tag post
3	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen sichtbar	Pulsation fraglich	
4	freies Transplantat	entfällt	entfällt	
5	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
6	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsation fraglich	keine Pulsationen	
7	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
8	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
9	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsation fraglich	keine Pulsationen	

Tier 1: Postoperativ gestaltete sich der Verlauf komplikationslos. Zum Opferungszeitpunkt liegt sowohl aktiv als auch passiv eine freie Beweglichkeit bei reizlosen Wundverhältnissen in beiden Kniegelenken vor. Im rechten Kniegelenk erreicht das Ersatzgewebe das Niveau des Umgebungsknorpels, hat eine weiße Farbe, ist jedoch an der Oberfläche grober strukturiert als dieser. In der Konsistenz ist es dem Gelenkflächenknorpel gleich. Randspalten sind im Transplantatbereich makroskopisch nicht erkennbar. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 2: Am zweiten postoperativen Tag zeigt sich eine breite Dehiszenz der Operationswunde des rechten Kniegelenkes. Bei der Revision kommt das Tier ad exitum. Es wird von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Tier 3: Der Verlauf wird durch einen Kniegelenkerguss rechts kompliziert, der am 14. postoperativen Tag abpunktiert wird. Es handelt sich um 4ml blutig-tingierte, seröse Flüssigkeit. Der weitere Verlauf ist komplikationslos. Beide Kniegelenke sind aktiv und passiv frei bewegen. Das Ersatzgewebe erreicht das Gelenkflächenniveau, im lateralen Defektbereich sind deutliche Randspalten sichtbar. Die Oberfläche des gesamten Gleitlagers ist leicht strukturiert und von weißer Farbe. Die Konsistenz des Ersatzgewebes unterscheidet sich nicht vom umgebenden Gelenkknorpel. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 4: Postoperativ zeigt sich ein komplikationsloser Verlauf. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit beider Kniegelenke. Am rechten Kniegelenk wurde das Gleitlager bis in das Niveau des Gelenkknorpels vollständig rekonstruiert. Die ursprünglichen Defektränder sind aufgrund einer partiellen Bindung an den Gelenkknorpel deutlich sichtbar. In seiner Konsistenz ist das Regenerat deutlich herabgesetzt und von weißer Farbe. Das übrige Gleitlager weist eine glatte, glänzende und insgesamt unauffällige Oberfläche auf. Das linke Kniegelenk ist inspektorisch unauffällig.

Tier 5: Postoperativ gestaltete sich der Verlauf komplikationslos. Beide Kniegelenke sind am Versuchsende sowohl aktiv als auch passiv uneingeschränkt beweglich. Der Defekt des femoropatellaren Gleitlagers des rechten Knie-

gelenkes ist durch das Regenerat vollständig restauriert. Die Oberfläche ist weiß und spiegelnd glatt, die Konsistenz entspricht der von Gelenkknorpel. Eine deutliche Adhärenz des Transplantatgewebes zum Umgebungsknorpel ist gegeben. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 6: Der Heilungsverlauf kompliziert sich durch eine Wunddehiszenz am rechten Kniegelenk, die am fünften postoperativen Tag nach ausgiebiger Spülung mit Wasserstoffperoxid (3%ige Lösung) durch erneute Naht verschlossen wird. Im weiteren Verlauf zeigen sich reizlose Wundverhältnisse an beiden Kniegelenken und keine Funktionseinschränkung des Gelenkapparates. Der Patellagleitbahndefekt ist durch das Ersatzgewebe vollständig ausgefüllt, Randspalten sind nicht sichtbar. Die Konsistenz und die Farbe des Ersatzgewebes unterscheiden sich nicht vom umgebenden Gelenkknorpel. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 7: Am 9. postoperative Tag zeigt sich eine kleine Wunddehiszenz am rechten Kniegelenk. Es erfolgt tägliche Spülung mit verdünnter Wasserstoffperoxidlösung und täglicher Verbandwechsel bis zum 14. postoperativen Tag. Der weitere Verlauf ist komplikationslos. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit in beiden Gelenken. Das neu gebildete Gewebe unterscheidet sich weder farblich noch in der Konsistenz von Gelenkknorpel. Der Defekt ist bis in das Gelenkknorpelniveau vorzüglich restauriert, es bestehen keine Randspalten. Palpatologisch erscheint das Ersatzgewebe derber als Gelenkknorpel. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 8: Postoperativ ungestörte Wundheilung, dennoch zeigt sich rechts eine Bewegungseinschränkung im Vergleich zur Gegenseite, welche klinisch als auffällig zu werten ist. Morphologisch findet sich im Bereich der Gleitbahn des rechten Kniegelenkes eine tiefe, über den ursprünglichen Defekt hinausgehende Zerstörung des Gelenkknorpels, welche bis in den darunterliegenden Knochen reicht. Das Transplantat ist zerstört, die Defektränder sind mottenfraßähnlich verändert. Für biochemische Untersuchungen kann kein Gewebe entnommen werden. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 9: Postoperativ ist der Verlauf komplikationslos. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit in beiden Kniegelenken. Das neu gebildete Gewebe unterscheidet sich weder farblich noch in der Konsistenz von Gelenkknorpel. Der Defekt ist nach allen Richtungen vollständig restauriert. Das linke Kniegelenk zeigt morphologisch keine Veränderungen.

4.2 Ergebnisse des Hauptversuchs

4.2.1 Postoperativer Verlauf

Im Hauptversuch sind keine postoperativen Todesfälle zu verzeichnen. Bei allen Tieren werden noch am Operationstag Spontanbewegung und Nahrungsaufnahme beobachtet. Wundheilungsstörungen treten in 3 Fällen auf und werden mit Lokalmaßnahmen (Wundreinigung mit Wasserstoffperoxid 3%, Touchierung mit Betaisodona und täglicher Verbandwechsel) innerhalb von vierzehn Tagen beherrscht. Ein operativer Revisionseingriff ist in keinem Fall erforderlich. Die Entfernung des Nahtmaterials erfolgt bei allen Tieren am zehnten postoperativen Tag.

4.2.2 Wassergehalt der Gewebeproben

In der Kontrollgruppe beträgt der durchschnittliche Wassergehalt $66,8\% \pm 1,36$. Bei den freien Transplantaten wird ein durchschnittlicher Wert von $74,2\% \pm 2,8$ erreicht und bei den gefäßgestielten Transplantaten ein Wassergehalt von $72,3\% \pm 1,46$. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung fünf, Seite 37. In der statistischen Analyse zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (T-Test für verbundene Stichproben; Kontrollgruppe → freie Transplantate: $p=0,46$; Kontrollgruppe → gefäßgestielte Transplantate: $p=0,19$; freie Transplantate → gefäßgestielte Transplantate: $p=0,53$) (Messwerte siehe Anlagen).

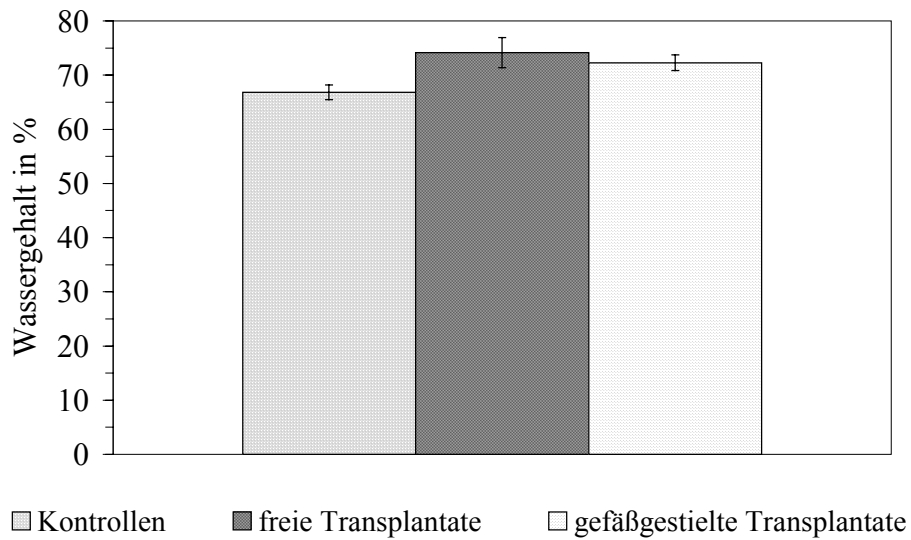


Abbildung fünf: Wassergehalt der Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Operationsmethode.

4.2.3 Gesamtkollagengehalt der Gewebeproben

Der durchschnittliche Gesamtkollagengehalt der Kontrollgruppe beträgt $61,2\% \pm 1,82$, bei den gefäßgestielten Transplantaten $65,4\% \pm 5,03$ und bei den freien Transplantaten $51,8\% \pm 2,37$; siehe Abbildung sechs.

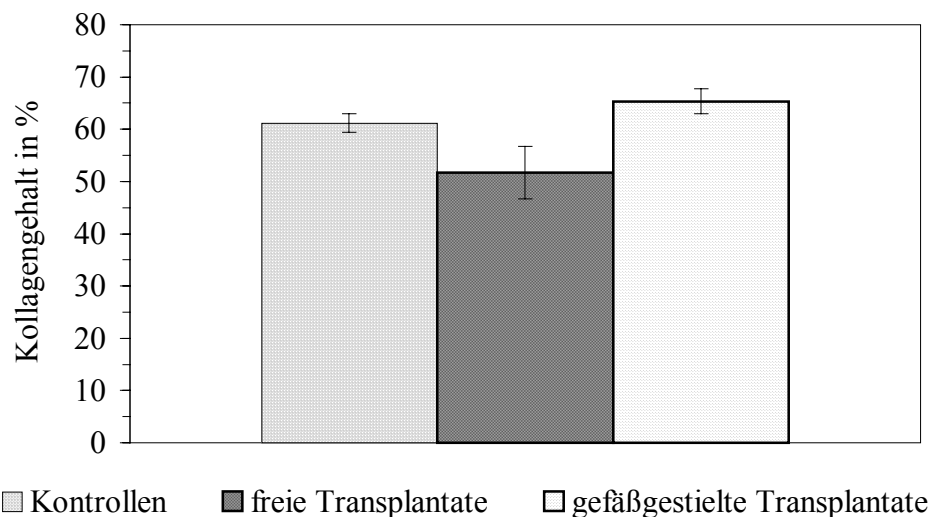


Abbildung sechs: Kollagengehalt der Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Operationsmethode.

Im Vergleich beider Transplantatgruppen zeigen sich die Unterschiede zwischen der Kontroll- und den beiden Transplantatgruppen als nicht signifikant (T-Test für verbundene Stichproben; Kontrollgruppe → freie Transplantate: $p=0,14$; Kontrollgruppe → gefäßgestielte Transplantate: $p=0,11$). Dahingegen findet sich im direkten Vergleich beider Transplantatgruppen ein signifikanter Unterschied (freie Transplantate → gefäßgestielte Transplantate: $p=0,01$).

4.2.4 Makroskopische Ergebnisse

Ein pannusartiger Überzug wird in keinem Präparat gefunden. Osteophyten sind auch nicht nachweisbar. Alle Präparate der Kontrollgruppe stellen sich mit spiegelnd glatter Oberfläche dar. Unregelmäßigkeiten der Oberfläche, Konsistenzminderungen oder Oberflächenveränderungen im Sinne von Fissuren und Kratern finden sich in dieser Gruppe nicht.



Abbildung sieben: Makroskopische Darstellung des patellaren Gleitlagers von Kaninchenkniegelenken 6 Monate post operationem. Links die Kontrollgruppe, in der Mitte die Gruppe, deren Defekte mit freien Periosttransplantaten versorgt wurden und rechts die Gruppe, deren Defekte mit mikrovaskulär reanastomisierten Transplantaten versorgt wurden.

Eine unauffällige, spiegelnd glatte Oberfläche, wird in der Gruppe der freien Transplantate (Gruppe 2) in nur einem von acht Präparaten, bei den gefäßgestielten Transplantaten (Gruppe 3) in zwei von elf Regeneraten erreicht. Angedeutete Unregelmäßigkeiten im Oberflächenbereich finden sich in Gruppe 2 bei einem Präparat, wobei das Ersatzgewebe das Niveau des Umgebungsknorpels erreicht und Randspalten nicht nachzuweisen sind. Dieses Ergebnis wird in Gruppe 3 in fünf von elf Präparaten erreicht. Der Hälfte der Präparate aus Gruppe 2 zeigt im Transplantatbereich eine mäßige Konsistenzminderung, angedeutete Randspalten und mäßige Unebenheiten der Oberfläche. In Gruppe 3 ist dies bei zwei von elf Transplantaten der Fall. Starke Oberflächenveränderungen mit ausgeprägtem Randspalt finden sich in Gruppe 2 in $\frac{1}{4}$ der Fälle, Gruppe 3 in zwei von elf Regeneraten. Klinische Bilder siehe Abbildung sieben auf Seite 38.

Zum Zeitpunkt des Versuchsendes sind bei allen Gefäßanastomosen Pulsationen der Arterien nachweisbar. Beurteilt werden die distalen Gefäßanteile direkt vor Einmündung in das Regenerat.

Die Durchgängigkeit der reanastomosierten Gefäße ist damit gegeben.

4.2.5 Histologische Ergebnisse

Art des prädominierenden Gewebes im Defekt

a.) Histomorphologie

Hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung findet sich in 16 von 19 Präparaten der Kontrollgruppe, zwei Präparate sind bei der histologischen Aufbereitung zerstört worden. Lediglich in einem Präparat stellte sich die Gelenkfläche als fibröses Gewebe dar.

In der Gruppe der freien Transplantate (Gruppe 2) kann in zwei von insgesamt acht Defekten hyalinähnlicher Knorpel, jedoch ohne typische Schichtung im Regenerat nachgewiesen werden. In sechs Präparaten herrscht fibröses Gewebe oder Knochen vor. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung acht, Seite 40.

Dieses Gewebe wird in den gefäßgestielten Transplantaten (Gruppe 3) lediglich zweimal bei insgesamt elf Präparaten gefunden. In einem Fall bildet sich inkomplett differenziertes mesenchymales Gewebe. Durch hyalinähnlichen Knorpel ohne typische Schichtung wird ein Transplantat im Gelenkflächenbereich ersetzt. In vier weiteren Fällen bildet sich hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung in Richtung zur Gelenkfläche hin. Unterhalb des Gelenkflächenbereichs findet sich bei allen Defekten der Gruppe 3 eine starke Schicht Bindegewebe. Zum basalen Knochen hin kann eine Verknöcherungstendenz im Sinne einer enchondralen Ossifikation bei den Präparaten gefunden werden, die hyalinähnlichen Knorpel bilden.

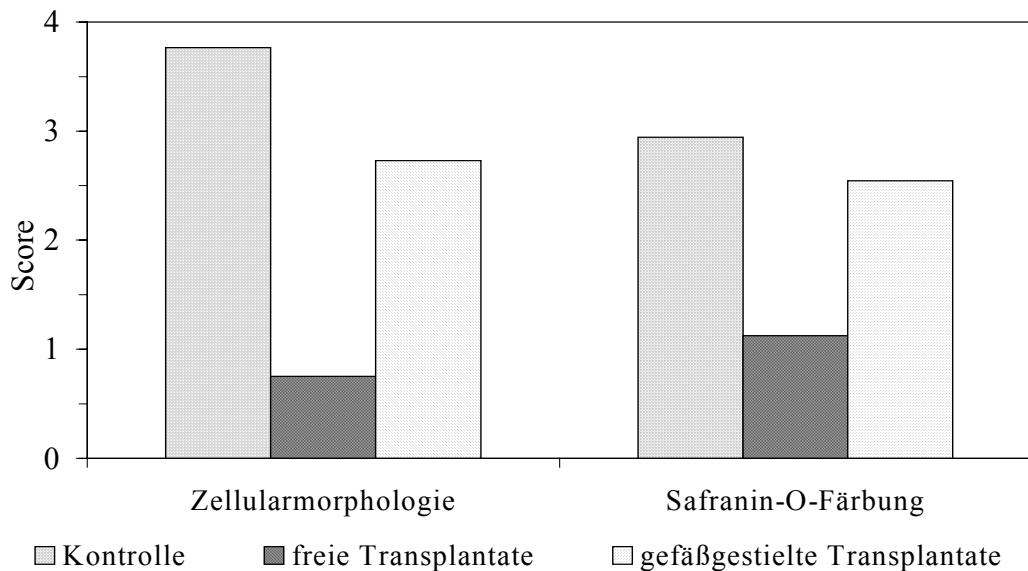


Abbildung acht: Wertigkeit morphologischer Parameter von Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

b.) Safranin-O-Färbung der Matrix

Die Safranin-O-Anfärbbarkeit der Matrix war in 16 Präparaten der Kontrollgruppe normal oder annähernd normal, in einem Präparat leicht vermindert.

Eine normale Anfärbung kann in Gruppe 2 in keinem Defekt gefunden werden. Zweimal ist die Färbbarkeit leicht vermindert. Der Hauptteil der Regenerate in

dieser Gruppe zeigt eine stark verminderte Färbung (in fünf von acht Präparaten). In einem Fall läßt sich keine Anfärbung erzielen.

In Gruppe 3 färbt sich das Gewebe aus sechs Defekten in der Safranin-O-Färbung normal an. Weitere fünf Präparate dieser Gruppe stellen sich mit leicht verminderter Anfärbbarkeit dar.

Strukturelle Charakteristika des neugebildeten Gewebes

a.) Oberflächenbeschaffenheit

Schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen werden in der Kontrollgruppe nicht beobachtet. In zwei Präparaten finden sich Fissuren im Knorpel bis zu 25% der Schichtdicke. Ein Gelenkbereich weist oberflächliche, horizontale Laminationen auf. In allen weiteren Fällen dieser Gruppe (14 Präparate) finden sich glatte und intakte Oberflächen.

Dieses Ergebnis wird in der Gruppe der freien Transplantate nur einmal gefunden. In zwei weiteren Regeneraten zeigen sich im Gelenkflächenbereich Fibrillationen und horizontale Laminationen. In einem Defektbereich können Fissuren bis zu 25% der Schichtdicke festgestellt werden. In der Hälfte der Präparate dieser Gruppe finden sich schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen, welche in der Gruppe der gefäßgestielten Transplantate nicht gefunden werden.

In Gruppe 3 können Fissuren bis 25% der Schichtdicke nur einmal festgestellt werden. In vier weiteren Defekten stellen sich oberflächliche, horizontale Laminationen dar. Ansonsten ist die Gelenkfläche im Transplantatbereich bei allen weiteren Präparaten (insgesamt 6) glatt und intakt.

b.) Strukturelle Integrität

Die strukturelle Integrität des Gelenkflächenbereichs in der Kontrollgruppe konnte in 16 Fällen als normal eingeschätzt werden. In einem Präparat können leichte Spalten oder Zysten nachgewiesen werden. Schwere Desintegrationen finden sich in dieser Gruppe nicht.

Bei den freien Periostlappentransplantaten stellen sich jedoch zwei Präparate der regenerierten Gelenkflächen mit schweren Desintegrationen dar. In fünf Präparaten dieser Gruppe können leichte Spalten oder Zysten gefunden werden. Nur ein Präparat kann strukturell als normal gewertet werden.

Schwere Desintegrationen im neugebildeten Gewebe können in Gruppe 3 nicht nachgewiesen werden. Inhomogenitäten in Form von leichten Spalten oder Zysten treten in fünf Fällen auf. Die restlichen sechs Regenerate stellen sich im histologischen Bild strukturell als normal dar.

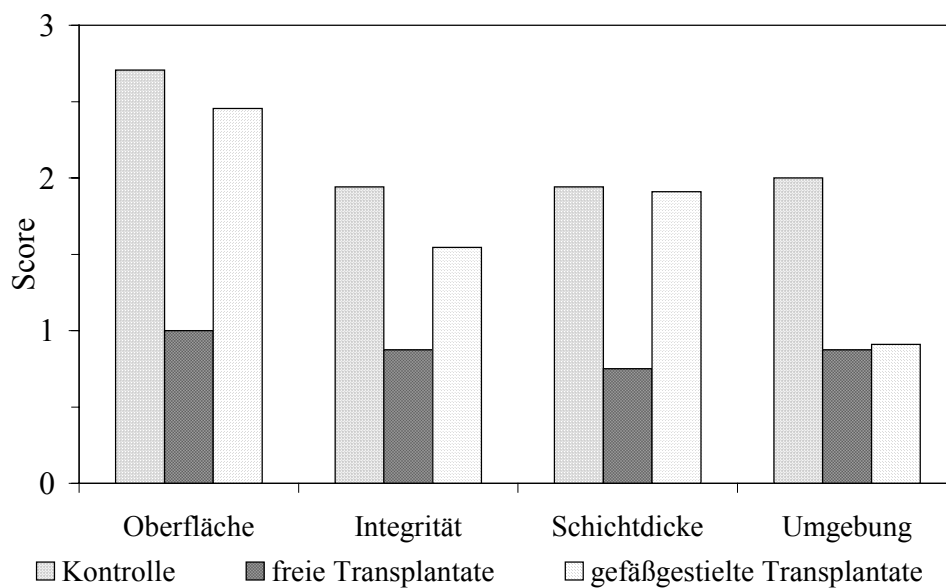


Abbildung neun: Wertigkeit struktureller Charakteristika bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

c.) Schichtdicke im Vergleich zum Oberflächenniveau des Umgebungsknorpels

Die Schichtdicke des Gelenkknorpels der Kontrollgruppe erreicht in 16 Präparaten der Präparate über die ganze Breite 100%. In einem Präparat erreicht die Schichtdicke partiell einen Wert über 50%. Eine Degeneration bis auf eine Höhe von weniger als 50% tritt bei den Kontrollen nicht auf.

In Gruppe 2 findet sich jedoch bei drei Regeneraten Ersatzgewebe in einer Höhe bis 50%. In weiteren vier Fällen konnte ein Wert über 50% bezogen auf das

Gelenkflächenniveau des Umgebungsknorpels erreicht werden. Ein vollständiger Ersatz auf der gesamten Breite wird in Gruppe 2 einmal erreicht.

Bei den gefäßgestielten Transplantaten wird in zehn Fällen ein vollständiger Ersatz der gesamten Breite erreicht. Einmal kann das Gelenkflächenniveau nur bis in eine Höhe von über 50% aufgebaut werden. Werte unterhalb von 50% treten hier nicht auf.

d.) Bindung zum Umgebungsknorpel

In den Gelenkflächen der Kontrollgruppe ist die Bindung zum Umgebungsknorpel an beiden Seiten komplett. Zur weiteren Auswertung wird allen Präparaten die volle Punktzahl gegeben.

Bei den freien Transplantaten kann in zwei Fällen keine Bindung des Regenerates an den Umgebungsknorpel erreicht werden. In weiteren fünf gesetzten Defekten ist diese Bindung entweder komplett an einer Seite oder partiell an beiden Seiten vorhanden. Eine komplette Bindung an beiden Seiten wird in dieser Gruppe einmal erreicht, in Gruppe 3 zweimal.

Eine einseitig vollständige oder beidseitig partielle Verbindung des neugebildeten Knorpelgewebes aus den Tieren der Gruppe 3 kann in sechs Präparaten beobachtet werden. Keine seitliche Bindung findet sich bei 3 Präparaten in dieser Gruppe.

Eine Übersicht zu den Bewertungen der strukturellen Charakteristika findet sich in Abbildung neun, Seite 42.

Zelluläre Veränderungen im neugebildeten Gewebe

a.) Zellzahl

Die Zellzahl ist bei 16 Präparaten der Kontrollgruppe unauffällig und kann daher als normal gewertet werden. In einem Fall wird eine diskrete Hyperzellularität beobachtet. Weitere Veränderungen werden nicht gefunden.

Bei dem Regenerationsgewebe der Transplantationsdefekte aus Gruppe 2 ist in einem Fall mit schwerste Hypo- bis Azellularität zu beobachten, weitere vier Präparate dieser Gruppe zeigen Veränderungen im Sinne einer mäßigen

Hypozellularität, welche in den Regeneraten der gefäßgestielten Transplantate einmal gefunden wird.

Eine mäßige Hyperzellularität wird bei den freien Transplantaten in 2 Fällen und bei den gefäßgestielten Transplantationsdefekten in 9 Fällen beobachtet. Es bilden sich die säulenartigen Anordnungen der Chondrozyten im gelenkflächennahen Knorpelgewebe aus; die streng radiäre Ausrichtung dieser Säulen fehlt jedoch. Auch die für den hyalinen Knorpel typischen zellfreien Höfe können nur vereinzelt gefunden werden.

In beiden Transplantatgruppen können morphologisch veränderte Chondrozyten nachgewiesen werden, die sich in einer Schicht sowohl oval als auch rund und in unterschiedlicher Größe darstellen. Ein histologisch unauffälliges Zellbild kann nur einmal in Gruppe 3 und einmal in Gruppe 2 gefunden werden.

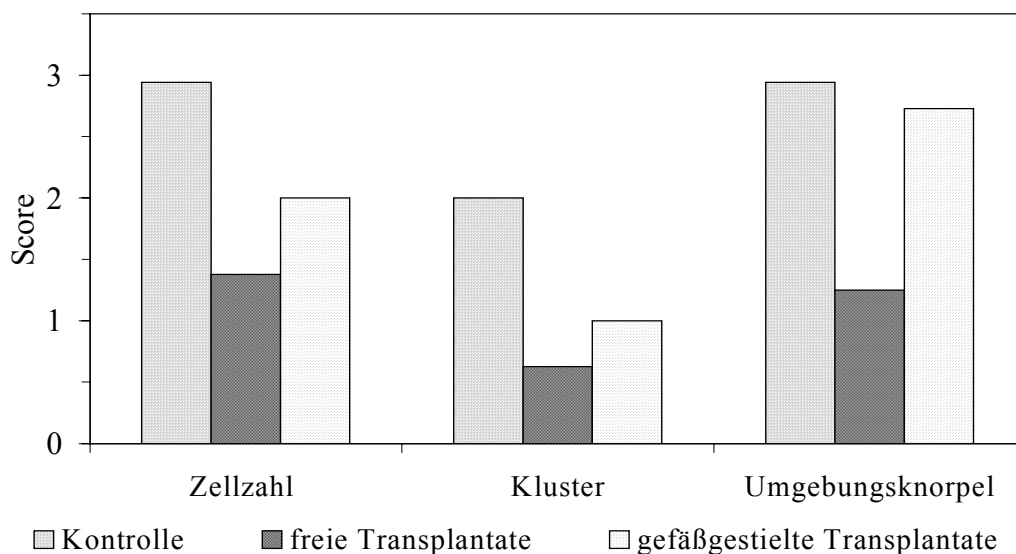


Abbildung zehn: Wertigkeit zellulärer und degenerativer Veränderungen bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

b.) Chondrozytencluster

In den Präparaten der Kontrollgruppe konnten keine Chondrozytencluster nachgewiesen werden. Bei den Defekten, die mit freien

Periostlappentransplantaten gedeckt werden, finden sich in fünf Präparaten Clusterbildungen, die bei weniger als 25% der Knorpelzellen auftreten.

In Gruppe 3 ist dies in allen Defekten der Fall. Clusterbildungen in mehr als 25% der Fälle können nur in der Gruppe der freien Transplantate bei drei Präparaten beobachtet werden.

Degenerative Veränderungen im Umgebungsknorpel

In 16 Kontrollgruppenpräparaten wird in den Gelenkflächenbereichen eine normale Zellularität und Anfärbung mit der Safranin-O-Färbung gefunden, nur ein Präparat zeigt einen mäßigen Färbbarkeitsverlust.

In Gruppe 2 fällt in einem Präparat schwerste Hypo- bis Azellularität auf. Eine Anfärbung mit Safranin-O ist in diesem Präparat nicht möglich. Die Hälfte der Präparate dieser Gruppe zeigt im Defektrandgebiet eine leichte bis mäßige Hypozellularität. In 3 Fällen kann der Umgebungsknorpel als normal gewertet werden; ein mäßiger Färbbarkeitsverlust mit Safranin-O ist hier jedoch auch zu verzeichnen.

Dieses Ergebnis kann auch bei den Regeneraten der gefäßgestielten Transplantate in drei Fällen gefunden werden. Weitere Degenerationen im defektnahen Knorpelbereich dieser Gruppe werden nicht gefunden. In weiteren acht Präparaten dieser Gruppe zeigt sich ein normales Färbungsverhalten in der Safranin-O-Färbung; histologisch stellt sich das Knorpelgewebe ohne Cluster mit normaler Zellularität dar.

Histologischer Score

In der Gesamtdarstellung aller genannten histologischen Merkmale zeigen sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sehr deutlich. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung 11f, Seite 46.

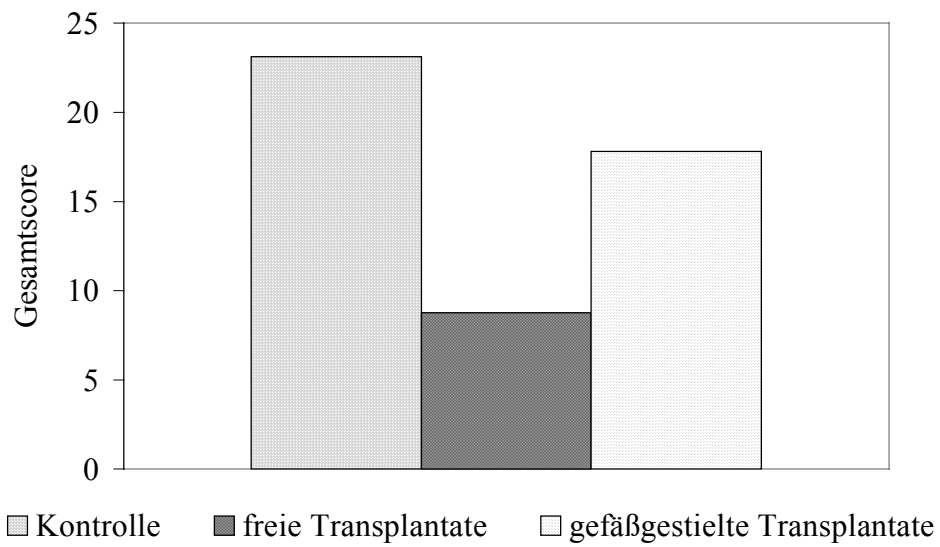


Abbildung 11f: Wertigkeit sämtlicher histologischer Parameter bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

5 Diskussion

Mit der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung wird gezeigt, dass gefäßgestielte Periostlappen von adulten Kaninchen in der Lage sind, sich in osteochondralen Kniegelenkdefekten des Kaninchens zu knorpelähnlichem Gewebe zu differenzieren.

Die Ergebnisse des Vorversuchs dienen der optimalen Gestaltung des Versuchsablaufs im Hauptversuch. So zeigte sich im Vorversuch, dass bei den vom medialen Tibiaaspekt gewonnenen, gefäßgestielten Periostlappen postoperativ und am Versuchsende die Durchgängigkeit der Gefäße nicht sicher beurteilbar ist. Da die Gefäße den Bereich des Kniegelenkes überbrücken müssen, ist eine Minderversorgung des Periostlappens durch mechanische Belastung im Sinne einer Gefäßkompression bei Flexion oder Zugbelastung bei Extension nicht ausgeschlossen. Im Hauptversuch werden die Periostlappen deshalb ausschließlich vom medialen Femuraspekt gewonnen und die Gefäßstiele mikrovaskulär reanastomosiert. Für diese Methode der Reanastomosierung spricht, dass sämtliche Mikroanastomosen sind zum Zeitpunkt des Versuchsendes sicher durchgängig sind.

Eine weitere Einflussgröße auf die Chondrogenese stellt die absolute Ischämiezeit der reanastomosierten Transplantate dar, die registriert wird und in dieser Untersuchung 45 Minuten nicht übersteigt. Andere Autoren untersuchten diesen Einfluss der intraoperativen Ischämie bei vaskularisiertem Periost, welches in die Atemwege transplantiert wird. Nach zweistündiger Unterbrechung der Blutzufuhr konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Chondrogenese gefunden werden [Naficy und Esclamado,1997].

Durch die verwendete Anästhesiemethode ist eine absolute Ruhigstellung der Tiere auch über einen längeren Zeitraum für die mikrochirurgischen Eingriffe ermöglicht. Auch die einfache Handhabung im Sinne einer guten Steuerbarkeit wird als sehr vorteilhaft beurteilt.

In der Literatur wird eine Vielzahl unterschiedlicher Defektformen, -größen und -lokalisationen beschrieben. Sie reicht von Einellochdefekten mit ein bis sechs

Millimeter Durchmesser bis zu vier Runddefekten an einem Gelenk, die an beiden Femurkondylen und in der Patellagleitbahn eingebracht wurden [Salter et al., 1980; Nelson et al., 1988]. Schalenförmige und stufenförmige Defekte [Rubak et al., 1982], die als chondral und osteochondral angesehen werden müssen, führen möglicherweise zu unterschiedlichen Reaktionsmustern der Periostlappentransplantate in den angrenzenden Geweben.

Paul et al. (1979) fordern in Übereinstimmung mit Wellnitz (1974 und 1976) eine weitestgehende Standardisierung der Versuchsbedingungen bezüglich Tierart, Defektherstellung, Defektgröße und -lokalisierung, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit kommen osteochondrale Stanzdefekte einer Größe von sechs mal vier Millimeter im femoropatellaren Gleitlager zur Anwendung, weil seit vielen Jahren in tierexperimentellen Studien Stanzdefekte routinemäßig angewendet werden [Häbler, 1925; Kunz et al., 1979; Regling et al. 1979]. Durch die großzügige Breite der Einzeldefekte ist ein Verschluss durch nichtregenerative Prozesse, wie zum Beispiel ein Defektverschluss der Ränder durch den hydrostatischen Gewebedruck, ausgeschlossen.

In unserem eigenen Hauptversuch konnten wir postoperative Todesfälle im Gegensatz zu Versuchen anderer Autoren [Engkvist, 1979; Engkvist und Ohlsen, 1979; Rubak (a), 1982; O'Driscoll et al., 1988; Delaney et al., 1989] nicht verzeichnen. Dies führen wir auf die strenge Einhaltung aseptischer Operationskautelen und auf den protektiven Effekt der perioperativen Antibiotikaphylaxe zurück. Sämtliche Eingriffe erfolgten unter antibiotischer Abschirmung mit Gentamycin. Die perioperative Antibiotikagabe wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ohne Infektionsprophylaxe hatte Rubak (a) (1982) zwei Todesfälle bei einer Gesamtzahl von 66 Tieren zu verzeichnen. Ohne spezifische Maßnahmen verstarben bei Kon (1981) zwei von 50 Tieren, bei O'Driscoll und Salter (1984) vier von 30. Albrecht et al. (1983) hatte trotz systemischer Antibiose mit Prokain-Benzathin-Penizillin zehn Prozent postoperative Infektionen.

Salter et al. (1981) und Dustmann und Puhl (1976) verwiesen auf einen positiven Effekt bei der Kombination lokaler und systemischer Antibiotikatherapie. Tiedtke et al. (1982) führten eine intraoperative Wundspülung mit Natriumchloridlösung

durch. Die Keimzahl wurde dadurch in ihren Untersuchungen auf 58,2% des Ausgangswertes gesenkt. Bei Spülung mit Natriumchloridlösung, Bacitracin und Neomycinsulfat konnte eine Keimzahlsenkung auf 5,1% beobachtet werden.

Unter Beachtung der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse und der eigenen Beobachtungen wird eine perioperative Antibiotikaphylaxe als sinnvoll angesehen. Insgesamt sind im Hauptversuch bei nur 3 von 38 Kniegelenken postoperative Wundinfektionen aufgetreten, die mit Lokalmaßnahmen (tägliche Wundreinigung mit dreiprozentiger Wasserstoffperoxidlösung, Betailsodona-Touchierung und Verbandwechsel) innerhalb von vierzehn Tagen beherrscht wurden.

Über vergleichbare Infektionsraten trotz systemischer Antibiose berichten auch andere Autoren [Furukawa et al., 1980; Salter et al., 1980; Albrecht et al., 1983; Kreder et al., 1994]. In den histologischen Präparaten finden sich sowohl im Knorpel-Knochengewebe als auch im umliegenden Bindegewebe keine Entzündungshinweise.

Als Transplantatbefestigung diente die Gewebeklebung mit Tissucol Duo S Kleber im Duplojekt-Verfahren. Für die Klebungen wird das Periost an Haltefäden aufgespannt und in den Defekt eingebracht. Anschließend wird das Transplantat mit dem Fibrinkleber unterspritzt, bis dieser an den Rändern austritt. Nach wenigen Sekunden ist eine ausreichende Transplantathaftung gewährleistet. Überstände werden nach dem Klebevorgang mit einem Skalpell abgeschnitten. Die Anwendung des Duplojekt-Systems gestaltet sich anwendungsfreundlich, außerdem wird eine hohe Klebefestigkeit erreicht, wie bereits von anderen Autoren beschrieben [Redl und Schlag, 1982; Bruns und Steinhagen, 1999].

Die Transplantatbefestigung durch Naht führte bei Kreder et al. (1994) zu einer Osteophytenbildung um die Nähte. In der eigenen Untersuchung werden keine Osteophyten in der makroskopischen Untersuchung gefunden. Hier könnte ein Vorteil der Fibrinklebung liegen. Da es bei keinem der insgesamt 9 Defekte des Vorversuchs zu einem Transplantatverlust oder zu einer Hemmung der Gelenkbewegung kam, wie sie bei einem intraartikulären Fremdkörper zu

erwarten wäre, wird das operative Verfahren im Hauptversuch beibehalten. Mangelnde Haftung trat dann auch in keinem Fall ein.

Postoperativ werden die Tiere bei normaler Käfigaktivität gehalten, eine Ruhigstellung erfolgt nicht. In einer Studie untersuchen O'Driscoll und Salter (1984) den Einfluss von kontinuierlich passiver Bewegung des Kniegelenkes nach Transplantation von periostalen Autotransplantaten, verglichen mit einer totalen Immobilisierung des Kniegelenkes. Durch die Bewegung der Kniegelenke scheint die Neochondrogenese gefördert zu werden [O'Driscoll und Salter, 1984]. Mow (1991) erzielt bei Kaninchen die besten Ergebnisse einer Knorpelregeneration von freien Periostlappen unter normaler Käfigaktivität. Auch Ritsilä und Mitarbeiter (1981) kommen zu dem Ergebnis, dass die Gelenkbewegung einen entscheidenden Faktor bei der Regeneration der Gelenkfläche darstellt.

Die Periostlappentransplantationen der vorliegenden Arbeit werden an adulten Tieren vorgenommen, da das Alter der Versuchstiere das Ergebnis wesentlich beeinflusst [Urist und McLean, 1952; Cohen und Lacroix, 1955; Ritsilä et al., 1972 und 1976]. Es gilt der Grundsatz: "Je jugendlicher das Periost, desto größer ist seine Kapazität" [Stock et al., 1991]. Periostlappen ausgewachsener Kaninchen besitzen ein wesentlich geringeres chondrogenetisches Potenzial als das adoleszenter [Poussa et al., 1981; Rubak (b), 1982; O'Driscoll und Salter, 1986; Delaney et al., 1989; Kreder, 1994]. Kreder untersuchte 1994 den Effekt des Spender- und Empfängeralters bei der Gelenkflächenrekonstruktion durch periostale Allotransplantate bei Kaninchen. Er bewies, dass das Alter der Spendertiere den wichtigsten Qualitätsfaktor für das regenerierte Gewebe darstellt.

Die Differenzierung gefäßgestielter Periostlappen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Wird das Periostlappentransplantat mit mikrovaskulärem Gefäßanschluss als Röhre angeordnet, so dass es den Innenraum zwischen zwei Frakturenden einer Extremität dicht umschließt, ist es in der Lage, Knochen zu bilden [Wildenberg et al., 1983; Takato et al., 1986]. Die Ursache dafür wird in der raumbegrenzenden Funktion gesehen und als "Konzept des vorgegebenen Raumes" bezeichnet [Stock et al., 1991].

Im Kaninchenmodell ist die chondrogenetische Potenz von freien und vaskularisierten Perichondriumlappen in den Atemwegen nachgewiesen. Als Spendergebiet diente Perichondrium der Aurikularregion. Dabei wurde eine signifikant höhere Knorpelproduktion bei den gefäßgestielten Lappen beobachtet [Hartig et al., 1994]. Die Ursache für die Knorpelbildung, im Gegensatz zur Knochenbildung durch das Transplantat, wird vor allem in der randbegrenzenden Knorpelumgebung und der Atemluft gesehen. Diese Aussage kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht gestützt werden, da hier eine Knorpelbildung unter Luftabschluss erfolgt, obwohl das Transplantat von Knorpelgewebe umgeben ist.

Andere Autoren verwendeten sowohl perichondrale als auch Periostlappen zur Rekonstruktion laryngotrachealer Knorpeldefekte [Naficy und Esclamado, 1997].

Die Faktoren, die über die osteogene beziehungsweise chondrogene Potenz der Transplantate entscheiden, sind unklar. Manche Autoren vermuten sie hauptsächlich in der Spenderregion [Ritsilä und Alhopuro, 1973; Sohn und Ohlsen, 1974; Cohen et al., 1985]. Für nicht-vaskularisierte Periostlappentransplantate konnten Fang und Miltner (1933) zeigen, dass Tibiaperiost dem Rippenperiost in der osteogenen Potenz überlegen ist. Altonen und Mitarbeiter (1977) konnten die Überlegenheit des Tibiaperiosts im Vergleich zu dem der Mandibula hinsichtlich des Knochenersatzes darstellen.

Für vaskularisierte Periostlappentransplantate ist der Unterschied der osteogenen Potenz zugunsten des Tibia- gegenüber dem Rippenperiost bestätigt [Finley et al., 1978; Wildenberg et al., 1983]. In dieser Untersuchung kommt Periost vom medialen Aspekt des Femurs zum Einsatz, da für die mikrochirurgisch anastomosierten Periostlappen eine mechanische Belastung durch Zug- oder Druckspannung, wie sie sich bei einem Tibialappen ergeben kann, ausgeschlossen wird. Die Periostentnahme erfolgt scharf. Zunächst wird das zu transplantierende Areal senkrecht zur Oberfläche umschnitten. Im Anschluss daran wird der Periostlappen mittels eines Periostelevatoriums gehoben. Bei diesem Vorgehen ist ein Verbleiben der Osteochondroprogenitorzellen am Transplantat gewährleistet [Amiel et al., 1985; Mow et al., 1991; Kreder et al., 1994].

Die Empfängerregion beeinflusst ebenfalls die Differenzierung der Periostlappen-transplantate. Rubak (1983) zeigte den Einfluss auf die Art der Differenzierung. In seinem Experiment wird ein künstlich gesetzter Defekt am Beckenkamm durch geflechtknochenartige Strukturen ausgefüllt, obwohl das Periost von einem Knochen mit enchondraler Ossifikation stammt. Er stellt weiter fest, dass Periosten den meisten Knochen bildet, wenn es dem Knochenmark anliegt und weniger, wenn es kortikalem Knochen benachbart ist. Diese Untersuchungsergebnisse können durch die eigene Arbeit gestützt werden. In allen Präparaten die hyalinähnlichen Knorpel bilden (zehn von 19 Präparaten der Gruppe 1 und 2), kann eine enchondrale Ossifikationstendenz zum Knochenmark hin festgestellt werden.

In der vorliegenden Untersuchung findet ein modifiziertes Auswertungsschema zur Beurteilung der histologischen Ergebnisse von O'Driscoll et al. (1988) Verwendung. Dieses Schema benutzt auch Dietzel (1996). Ein Vorteil dieses Schemas ist eine morphologische Unterscheidung der entnommenen Proben in Regenerate mit und ohne typische Schichtung des hyalinknorpelartigen Gewebes. Dieses morphologische Kriterium könnte unter anderem für einen biomechanischen und damit auch funktionellen Unterschied des neugebildeten Gewebes verantwortlich sein. Um die Ergebnisse mit der Literatur vergleichen zu können, müssen Knorpelregenerate mit typischer und ohne typische Schichtung zusammengefasst werden, da andere Autoren eine solche Differenzierung nicht vornehmen.

In der eigenen Arbeit liegt in der Gruppe der freien Transplantate hyalinähnlicher Knorpel in 25% der Defekte vor. In der Literatur finden sich in ähnlichen Gruppen höhere Werte von 35% bis 70% [O'Driscoll et Salter, 1984; Mow et al., 1991; Kreder et al., 1994], die genaue Betrachtung der Ergebnisse erklärt jedoch die Unterschiede. Mow et al. (1991) findet seine Ergebnisse nach einer postoperativen Beobachtungsphase von acht Wochen, die eigenen Untersuchungen umfassen einen Zeitraum von sechs Monaten. In dem Ersatzgewebe findet er in der oberflächlichen Zone häufig Fibrillationen. Diese mikrostrukturellen Probleme können die Langzeitprognose limitieren [Mow et al., 1991].

Dietzel führt 1996 eine Longitudinalstudie zum Vergleich verschiedener Fixationsmethoden von Periosttransplantaten im Kaninchenkniegelenk durch. Seine morphologischen Ergebnisse zeigen hinsichtlich der Gelenkflächenrekonstruktion ein Maximum im Bewertungsscore von der achten bis zwölften postoperativen Woche, welches sich nach sechs Monaten um bis zu 35% reduziert und dann bis zu einem Jahr konstant bleibt. Auch andere Autoren finden in den ersten postoperativen Wochen "hyalinen Knorpel", der sich jedoch zu späteren Zeitpunkten in Faserknorpel umwandelt oder bindegewebig durchsetzt wird [Mommsen et al., 1977; Cheung et al. 1980; Furukawa et al., 1980; Cai et al., 1998]. Diese Ergebnisse werden durch die eigene Untersuchung in der Gruppe der freien Transplantate gestützt, in der bei 75% der Defekte fibröses Gewebe vorherrscht.

Ein weiterer entscheidender Unterschied ist im Alter der Versuchstiere zu suchen. Andere Autoren verwendeten Jungtiere mit nicht verschlossenen Epiphysenfugen für ihre Versuche [O'Driscoll und Salter, 1984]. Wie bereits dargestellt, besitzt Periost, welches von adoleszenten Tieren gewonnen wird, ein wesentlich höheres chondrogenetisches Potenzial als das adulter Tiere. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, das sich bei O'Driscoll und Salter (1984), unter dem Einfluss einer kontinuierlich passiven Bewegung in 59% der gesetzten Defekte hyalinähnlicher Knorpel bildet, während es in der eigenen Untersuchung deutlich weniger sind. Kreder et al. (1994) finden zwischen 31% und 36% hyalinähnlichen Knorpel in der Gruppe der Autotransplantate bei adulten Kaninchen.

Aufgrund der Verwendung adulter Tiere scheint diese Untersuchung mit der eigenen vergleichbar, obwohl der Untersuchungszeitpunkt bei Kreder et al. Bereits sechs Wochen nach der Transplantation liegt. Es liegen in der Literatur keine Ergebnisse dafür vor, dass sich die morphologischen, biomechanischen oder chemischen Eigenschaften der Transplantate in einer längeren Untersuchungsdauer verbessern.

Die besten Resultate finden sich in der eigenen Untersuchung bei der Gruppe der gefäßgestielten Transplantate. Eine hyalinartige Umwandlung erfahren ca. $\frac{3}{4}$ der Transplantate, die Färbung mit Safranin-O ist bei allen Präparaten dieser Gruppe normal oder leicht vermindert als Indikator für einen mindestens annähernd

normalen Glykosaminoglykangehalt. Es zeigt sich in dieser Gruppe ein befriedigendes Regenerationsverhalten, welches in nur drei von elf Regeneraten die typischen degenerativen Langzeitveränderungen nach sechs Monaten zeigt. Bei den freien Transplantaten findet sich nach diesem Zeitraum kein Transplantat mit normaler Safranin-O-Färbung, zwei von acht Gewebeproben erscheinen vermindert angefärbt. Auch hier zeigt sich die deutliche Überlegenheit der gefäßgestielten Transplantate. In dieser Gruppe finden sich in sechs von elf Präparaten glatte und intakte Oberflächen, weitere vier stellen sich mit oberflächlichen Laminationen dar, während sich bei den restaurierten Defekten der freien Transplantate in der Hälfte der Fälle schwerste Spaltbildungen und Fibrillationen zeigen. Auch makroskopisch zeigen sich bei weiteren vier von acht Regeneraten mäßige Unebenheiten und Randspalten in der Oberfläche. Eine als normal anzusehende strukturelle Integrität findet sich in dieser Gruppe in nur einem Präparat, in Gruppe 3 jedoch in über der Hälfte der Fälle.

Als Ursache kann eine biologische Minderwertigkeit des von den freien Transplantaten gebildeten Neoknorpels angenommen werden. Es zeichnet sich ein histologisches Bild ab, welches den Veränderungen einer Osteoarthritis gleicht. Dort entsteht zunächst ein Glanzverlust der Oberfläche. Später nimmt die Konsistenz des Gelenkknorpels ab und umschriebene Aufrauungen werden sichtbar. Letztendlich zeigen sich deutliche Defekte bis zum vollständigen Knorpelverlust. Diese Beobachtungen werden auch von Furukawa et al. [1980] bestätigt. Unter dem Einfluss der Vaskularisation scheint sich ein Regenerat zu bilden, welches unter den gegebenen Versuchsbedingungen dauerhafter ist.

Deutliche Unterschiede finden sich auch hinsichtlich der Schichtdicke verglichen mit dem Niveau des Umgebungsknorpels. Ein vollständiger Ersatz auf der gesamten Höhe wird in Gruppe 2 einmal erreicht, bei den gefäßgestielten Transplantaten in zehn von elf Fällen. Dies entspricht fast dem Wert der Kontrollgruppe. Dass in der Kontrollgruppe nicht bei allen Präparaten eine unauffällige Gelenkfläche gefunden wird, kann als Folge des chirurgischen Traumas gewertet werden. Hier zeigt sich, wie empfindlich die Gelenkstruktur auf ein äußeres Trauma reagieren kann. Unklar bleibt, ob es sich in Gruppe 2 um degenerative Veränderungen handelt, oder ob das Gelenkflächenniveau des

Umgebungsknorpels primär nicht erreicht wurde. Da die Regenerate der freien Transplantate in der Literatur das Gelenkflächenniveau in einem Untersuchungszeitraum von sechs Wochen bis zu drei Monaten häufig erreichen [Furukawa et al., 1980; O'Driscoll et al., 1984; Kreder et al., 1994], könnte es sich hier auch um einen sekundären Degenerationsprozess handeln.

Für beide Transplantatgruppen ist im histologischen Bild eine Ossifikationsfront nach basal zu finden, welche bei den vaskularisierten Transplantaten kräftiger ausgebildet ist. Ähnliche Verknöcherungsansätze finden sich bei Vachon et al. [1991], der seine Untersuchungen an Pferden durchführte. Durch Ausbildung einer subchondralen Knochenplatte entsteht für die freien Transplantate eine veränderte Stoffwechselsituation im Sinne eines einseitig offenen Systems. Dies könnte zu einer geminderten Stoffwechselaktivität führen, da es sich bei dem neugebildeten Gewebe nicht um originären Gelenkknorpel handelt, für den diese Situation physiologisch ist.

Ob diese Ossifikationsprozesse bis zur Gelenkfläche fortschreiten, bleibt unklar. Diese Frage kann nur durch längere Nachuntersuchungsintervalle beantwortet werden.

Die seitliche Bindung der neugebildeten Gewebe wird in beiden Transplantatgruppen nur partiell oder nicht erreicht. Mow et al. (1991) finden dieselben Ergebnisse. Die Erklärung könnte einerseits in der Technik der Fibrinklebung zu finden sein. Die im basalen Bereich bei allen Präparaten anzutreffende vollständige Verbindung kann als Zeichen einer raschen Fibrinkleberauflösung durch das stoffwechselaktive Periostgewebe gewertet werden. Im Bereich des bradytrophen Gewebes an den Schnittkanten des ursprünglichen Gelenkknorpels kann der Fibrinkleber als Sperrschicht fungieren und eine Verbindung der Gewebe verhindern. Andererseits findet sich im Knorpelgewebe ausgewachsener Tiere eine verminderte Zellteilungsrate im Vergleich zum physiologischen Wachstumsprozess. Im hochdifferenzierten Knorpelgewebe besitzt der einzelne Chondrozyt eine limitierte Proliferations- und Migrationskapazität. Die proliferative Gewebeantwort auf den gesetzten Defekt durch das umliegende Knorpelgewebe ist also begrenzt. Dies könnte auch die Erklärung für die grundsätzlich besseren Versuchsergebnisse bei juvenilen Tieren sein.

Die Auswertung der Zellzahlen zeigt den deutlichen Unterschied der Regenerate zu originärem Gelenkknorpel. Während in fast allen Präparaten der Kontrollgruppe eine normale Zellzahl gefunden wird, kann diese in den beiden anderen Gruppen nur je einmal nachgewiesen werden. Der Hauptteil der Transplantationsdefekte aus Gruppe 3 stellt sich mit mäßiger Hyperzellularität dar (neun von elf Präparaten), während bei den freien Transplantaten die Regenerate in der Hälfte der Fälle eine mäßige Hypozellularität aufweisen. Diese Hypozellularität findet auch Mow (1991) in seinen Präparaten.

Betrachtet man den Vorgang der Neoknorpeldifferenzierung, so kann der embryonale Knorpeldifferenzierungsprozess nachvollzogen werden. Auch dort kommt es zu einer Hyperzellularität im Gewebe, die sich durch Zunahme der Produktion einer extrazellulären Matrix nivelliert. Dadurch könnte die Hyperzellularität in den Regeneraten der gefäßgestielten Transplantate erklärt werden. Zusätzlich wird in beiden Transplantatgruppen eine Chondrozytenclusterbildung beobachtet, die in den Kontrollgruppenpräparaten nicht nachweisbar ist. Bei den Defekten, die mit freien Periostlappentransplantaten gedeckt werden, finden sich bei fünf Präparaten Clusterbildungen, die bei weniger als 25% der Knorpelzellen auftreten. In Gruppe 3 ist dies in allen Defekten der Fall. Clusterbildungen in mehr als 25% der Fälle können nur in Gruppe 2 bei drei Präparaten beobachtet werden. Eine ausgeprägte Clusterbildung in Verbindung mit Hypozellularität, wie sie in Gruppe 2 auftritt, kann einen Hinweis auf Zelluntergänge geben.

Im physiologischen Wachstumsprozess findet sich eine wohldosierte und langzeitige Belastungssteigerung als positiver Reiz für das Knorpelgewebe [Mohr, 1984]. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen unterliegt das Gewebe jedoch der Belastung einer Spontanbewegung, die ungleich höher ist. Dieser Belastung scheint das durch gefäßgestielte Transplantate gebildete Gewebe eher widerstehen zu können. Die hauptsächlich milden degenerativen Veränderungen im umgebenden Knorpelgewebe sind vorwiegend auf das chirurgische Trauma zurückzuführen [Dietzel, 1996].

Bei den wenigen, starken Veränderungen des Umgebungsknorpels in Gruppe 2 fällt in den gleichen Präparaten die fehlende Verbindung zwischen Neoknorpel und Umgebungsknorpel auf. Zusätzlich ist die Defekthöhe unzureichend

restauriert und weist sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch schwerste Spaltbildungen auf. Daraus ergibt sich eine Belastung für das originäre Knorpelgewebe, auf die es mit einer höheren Degenerationsrate reagiert.

Scheinbar widersprüchlich erscheinen die Ergebnisse, die bezüglich des Kollagengehaltes im Neoknorpel gefunden werden. Furukawa (1980) findet in seiner Untersuchung einen erhöhten Kollagengehalt in den Gewebeproben, Mow (1991) dagegen einen erniedrigten verglichen mit originärem Gelenkknorpel. Eine mögliche Erklärung findet sich in der Untersuchung von Kreder et al. (1994), in der der Einfluss des Spender- und Empfängeralters verschiedener Tiere verglichen wird. Die höchste Syntheserate wird in der Gruppe verzeichnet, in der Donor und Akzeptor adolescent sind (82%), die geringste Syntheserate entfällt auf die Gruppe der adulten Tiere (20%). In der eigenen Untersuchung zeigt sich in den mit freien Transplantaten versorgten Defekte ein gegenüber den Kontrollen erniedrigter Gesamtkollagengehalt von 51,8% (Kontrolle: 61,2%). Zahlenwerte können hier nicht verglichen werden, da bei Kreder (1994) Kollagensubtypen bestimmt werden. In der eigenen Untersuchung wird aufgrund der geringen Fallzahl auf eine Kollagentypisierung verzichtet. Für die Gruppe der freien Transplantate stimmen die Ergebnisse mit denen von Mow (1991) und Kreder et al. (1994) überein. Furukawa führt seine Untersuchung an Kaninchen durch, die keine verschlossenen Epiphysenfugen aufweisen. Die Tiere der eigenen Untersuchung weisen zum Operationszeitpunkt verschlossenen Epiphysenfugen auf. Die Vaskularisation des Periosts in Gruppe 3 scheint jedoch eine erhöhte Syntheserate des Gesamtkollagens zu ermöglichen, die dem juveniler Tiere ähnlich erscheint.

Auch andere Autoren haben den positiven Einfluss des Sauerstoffgehaltes der Atemluft auf die Chondrogeneserate unter in-vitro-Bedingungen untersucht und festgestellt, dass die besten Ergebnisse bei einem Sauerstoffgehalt von 12-15% erzielt werden [O'Driscoll et al., 1997]. Hier könnte eine Erklärung der höheren Kollagensyntheserate der gefäßgestielten Transplantate liegen.

In beiden Transplantatgruppen ist eine Zunahme des Wassergehaltes gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen, die am höchsten in der Gruppe der freien Transplantate ist. Manche Autoren sehen die Ursache in einem Kollagenetzdefekt,

welches durch das Einreißen des kollagenen Netzwerkes entsteht [Maroudas und Bannon, 1977; Maroudas et al., 1985]. Bestätigt wird das durch die Ergebnisse von Kikuchi et al. (1998), der nach intraartikulärer Kollagenaseinjektion einen erhöhten Wassergehalt im Gelenkknorpel nachweist. Dies führt zu einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Quelldruck der Proteoglykane. Andere Autoren sehen die Ursache in einem Verlust eines Teils der Proteoglykane, wodurch den zurückgebliebenen Aggregaten mehr hydrophile Gruppen zur Verfügung stehen [Mankin und Trasher, 1975]. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb in dem Hauptteil aller Präparate der makroskopischen Untersuchung eine Konsistenzminderung festzustellen ist.

Mit der Transplantation gefäßgestielter Periostlappen können in diesem Tierexperiment osteochondrale Gelenkflächendefekte bei adulten Kaninchen mit einem hyalinknorpelartigen Gewebe ausgefüllt werden. Dieses Gewebe ist in der Lage, den mechanischen Belastungen über den Zeitraum von 6 Monaten standzuhalten. Auch wenn kein originärer Gelenkknorpel gebildet wird, so erweist sich diese Methode einer freien Periosttransplantation als überlegen. Eine Verbesserung der Qualität des Ersatzgewebes ist durch Änderung der Versuchsbedingungen denkbar. Durch die Vaskularisation der Transplantate scheint eine Annäherung an embryonale und postnatale Wachstumsbedingungen möglich, die sich positiv auf die Bildung des Neoknorpels auswirkt. Durch eine Optimierung der Versuchsbedingungen und Annäherung an die natürlichen Wachstumsbedingungen könnte die Qualität der Regenerate weiter verbessert werden. Dann wäre die Entwicklung einer klinisch relevanten Behandlungsmethode möglich.

6 Zusammenfassung

Die Therapie traumatischer und degenerativer Gelenkflächendefekte stellt bis heute ein ungelöstes Problem dar, da die angewandten klinischen Behandlungsmaßnahmen aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels unbefriedigende Langzeitergebnisse hervorbringen. Dies ist der Ausgangspunkt für das ständige Bemühen, neue biologische Behandlungskonzepte für die Therapie von Gelenkflächendefekten zu finden. Die eigene tierexperimentelle Untersuchung soll feststellen, ob gefäßgestielte Periostlappen adulter Kaninchen in der Lage sind, sich in hyalinähnlichen Knorpel zu differenzieren und den physiologischen Alltagsbelastungen über einen Zeitraum von sechs Monaten standzuhalten. Anhand einer Vorversuchsreihe wird dazu ein Tiermodell entwickelt. Im Hauptversuch wird an neunzehn Tieren in Injektionsnarkose ein osteochondraler Defekt im femoropatellaren Gleitlager des rechten Kniegelenkes gesetzt, welcher mit gefäßgestielten bzw. freien Periostlappen vom medialen Femur versorgt wird. Dazu wird das Periost mit der Kambiumzellschicht zum Gelenkinnern orientiert und mit Fibrinkleber befestigt. Die kontralaterale Femurgelenkfläche dient als Kontrolle. Nach sechsmonatiger Standzeit unter Spontanbewegung erfolgt eine abschließende klinische Kontrolle und in der Gruppe der mikrovaskulär anastomosierten Transplantate eine visuelle Überprüfung auf Durchgängigkeit der Anastomosen in Narkose. Nach Opferung der Tiere werden die distalen Femuranteile beidseits entnommen. Es folgt eine makroskopische, histologische und biochemische Analyse. Klinisch werden befriedigende Resultate erzielt, das heißt, es sind keine Bewegungsauffälligkeiten oder klinisch auffällige Befunde an den Tieren nachweisbar. Bei den durch gefäßgestielte Transplantate versorgten Defekten zeigen sich deutlich weniger degenerative Veränderungen als bei den freien Transplantaten. Der Defektaufbau der perfundierten Transplantate erfolgt in voller Höhe, die transversale Einbindung ist jedoch nicht optimal. In der histologischen Untersuchung zeigt sich eine deutliche Überlegenheit zugunsten der gefäßgestielten Transplantatgruppe. Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung lassen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Wassergehaltes der Gewebeproben erkennen, bezüglich

des Kollagengehaltes dagegen ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Transplantatgruppen. Insgesamt zeigt sich jedoch die biologische Minderwertigkeit des Neoknorpels beider Gruppen gegenüber dem originären Gelenkknorpel der Kontrollgruppe.

Die Methode der mikrovaskulär anastomosierten Periostlappen erweist sich in diesem Versuch gegenüber den freien Transplantaten als überlegen, obwohl sich in keiner Gruppe originärer Gelenkknorpel bildet. Durch die Perfusion scheint sich ein Stoffwechsel im Neoknorpel auszubilden, der dem juveniler Tiere vergleichbar ist. Eine Qualitätsverbesserung des Ersatzgewebes durch Änderung der Versuchsbedingungen ist denkbar, insbesondere wenn eine Annäherung an embryonale und postnatale Wachstumsbedingungen zur Angleichung des Neoknorpels an den hyalinen Gelenkknorpel führt. Unter diesen Bedingungen wäre die Entwicklung einer klinisch relevanten Behandlungsmethode möglich.

7 Literaturverzeichnis:

1. Albrecht F, Roessner A, Zimmermann E: Closure of osteochondral lesions using chondral fragments and fibrin adhesive. *Arch Orthop Traumat Surg* 101 (1983) 213-217
2. Altonen RD, Ylipaavalniemi P, Ranta R: Bone formation with free periosteum around the root of the rabbit tooth. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 73 (1977) 32
3. Amiel D, Coutts RD, Abel M, Stewart W, Harwood F, Akeson WH: Rib perichondral grafts for the repair of full-thickness articular cartilage defects. *J Bone Joint Surg* 67 (1985) 911-920
4. Bruns J, Steinhagen J: Transplantation of chondrogenic tissue in the treatment of lesions of the articular cartilage. *Orthopäde* 28 (1999) 52-60
5. Cai S, Hu R, Wang H: Repair of cartilage defect in joint with transplantation of cryopreserved homologous embryonic periosteum of rabbits. *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Chien Wai Ko Tsa Chih* 12 (1998) 117-121
6. Carranza-Bencano A, Perez-Tinao M, Ballesteros-Vazquez P, Armas-Padron JR, Hevia-Alonso A, Martos-Crespo F: Comparative study of the reconstruction of articular cartilage defects with free costal perichondrial grafts and free tibial periosteal grafts: An experimental study on rabbits. *Calcif Tissue Int* 65 (1999) 402-407
7. Cheung HS, Lynch KL, Johanson RP, Brewer BJ: Transitions in collagen types during articular cartilage repair. *Arthritis Rheum* 23 (1980) 662
8. Cohen J, Lacroix P: Bone and cartilage formation by periosteum. *J Bone Jt Surg* 37 (1955) 717

9. Crock JG, Morrison WA: A vascularised periosteal flap: anatomical study. *Br J Plast Surg* 45 (1992) 474-478
10. Curtin WA, Reville WJ, Brady MP: Quantitative and morphological observations on the ultrastructure of articular tissue generated from free periosteal grafts. *J Electron Microsc Tokyo* 41 (1992) 82-90
11. Delaney JP, O'Driscoll SW, Salter RB: Neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts in an immobilized and paralysed limb. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 248 (1989) 278-282
12. Dietzel R: Gelenkknorpelersatz durch autogene Periostlappentransplantate am adulten Kaninchen. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (1996)
13. Dustmann HO, Puhl W: Altersabhängige Heilungsmöglichkeiten von Knorpelwunden (Tierexperimentelle Untersuchungen). *Z Orthop* 114 (1976) 749-764
14. Engkvist O: Reconstruction of patellar articular cartilage with free autogenous perichondrial grafts. An experimental study in dogs. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13 (1979) 361-369
15. Engkvist O, Ohlsen L: Reconstruction of articular cartilage with free autogenous perichondrial grafts. An experimental investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13 (1979) 269-274
16. Fang HC, Miltner LJ: Comparison of osteogenic power of periosteal transplants from rib and tibia. *Proc Soc Exp Biol Med* 31 (1933) 386-388
17. Finley JM, Acland RD, Wood MB: Revaskularized periosteal grafts - a new method to produce functional new bone without bone grafting. *Plast Reconstr Surg* 61 (1978) 1-6

18. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ: Biochemical studies on repair cartilage resurfacing. Experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg* 62 (1980) 79-89
19. Häbler C: Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration des Gelenkknorpels. *Bruns Beitr Klin Chir Berlin* 134 (1925) 602-640
20. Harase Y, Valauri FA, Buncke HJ: Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: An experimental model in the rabbit. *Ann Plast Surg* 21 (1988) 342-347
21. Hartig GK, Esclamado RM, Telian SA: Comparison of the chondrogenic potential of free and vascularized perichondrium in the airway. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 103 (1994) 9-15
22. Hoikka V, Jaroma H, Ritsilä V: Reconstruction of patellar cartilage defects with free periosteal grafts: a 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 61 (1990) 36
23. Hsu M, Umeda H, Nishijima K: An experimental study of the osteogenicity of free periosteal allografts with cyclosporine A administration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 21 (1992) 178-182
24. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T: Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6 (1998) 177-186
25. Kon M: Cartilage formation from perichondrium in a weight-bearing joint. An experimental study. *Eur Surg Res* 13 (1981) 387-396
26. Korkala O, Hukkanen H: Autogenous osteoperiosteal grafts in reconstruction of full-thickness joint surface defects. *Int Orthop* 15 (1991) 233

27. Kreder HJ, Moran M, Keeley FW, Salter RB: Biologic resurfacing of a major joint defect with cytopreserved periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin Orthop* 300 (1994) 288-296
28. Kunz JG, Wellnitz U, Paul R, Süffert R: Über die proliferative Aktivität der Chondrozyten bei der reparativen Regeneration von Gelenkknorpelwunden. *Wiss Z d Humboldt Universität zu Berlin, Math nat R XXVIII* 1 (1979) 49-52
29. Liu JY, Wang D, Cheng HH: Experimental study of the osteogenic capacity of periosteal allografts: a preliminary report. *Microsurgery* 15 (1994) 87-92
30. Mankin HJ, Trasher AZ: Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *Am J Bone Joint Surg* 57 (1975) 76-79
31. Mark von der K, Glückert K: Biochemische und molekularbiologische Aspekte zur Früherfassung humaner Arthrosen. *Orthopäde* 19 (1990) 2-15
32. Maroudas A, Bannan C: Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 36 (1977) 399-406
33. Maroudas A, Ziv I, Weisman N, Venn M: Studies of hydration and swelling pressure in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* 22 (1985) 159-169
34. Menck J, Bertram C, Lierse W: Sectorial angioarchitecture of the human tibia. *Acta Anat Basel* 143 (1992) 67-73
35. Messner K, Gillquist J: Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials* 14 (1993) 513-521

36. Mohr W: Pathologie der Gelenke und Weichteiltumore. In: Doerr W, Seifert G (Hrsg): Spezielle pathologische Anatomie, Band 18/1, Springer Verlag, Berlin, 1984, S. 133-190 und 231-548
37. Mommsen U, Junghbluth KH, Dalling G: Der Knorpeldefekt im Experiment. *H Unfallheilkunde* 129 (1977) 357-360
38. Moran ME, Kim HK, Salter RB: Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion. *J Bone Joint Surg Br* 74 (1992) 659-667
39. Mow VC, Ratcliff A, Rosenwasser MP, Buckwalter JA: Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a high weight bearing area of knee joint: a tissue engineering study. *J Biomech Engineering* 113 (1991) 198-207
40. Naficy S, Esclamado RM: Effect of intraoperative ischemia on chondrogenesis by vascularized auricular perichondrium grafted in the airway. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106 (1997) 237-239
41. Nagamoto N, Iyama K, Kitaoka M, Ninomiya Y, Yoshioka H, Mizuta H, Takagi K: Rapid expression of collagen type X gene of non-hypertrophic chondrocytes in the grafted chick periosteum demonstrated by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41 (1993) 679-684
42. Nelson BH, Anderson DD, Brand RA, Brown TD: Effect of osteochondral defects on articular cartilage. *Acta Orthop Scan* 59 (1988) 574-579
43. Noguchi T, Oka M, Neo M, Yamamuro T: Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 302 (1994) 251-258
44. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS, Commisio CN: Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res* 15 (1997) 682-687

45. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 70 (1988) 595-606
46. O'Driscoll SW, Salter RB: The induction of neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An Experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 66 (1984) 1248
47. O'Driscoll SW, Salter RB: The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis using autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 208 (1986) 131-140
48. Orr TE, Patel AM, Wong B, Hatzigiannis GP, Minas T, Spector M: Attachment of periosteal grafts to articular cartilage with fibrin sealant. *J Biomed Mater Res* 44 (1999) 308-313
49. Paul UE, Petzold G, Wellmitz: Die Versuchsanordnung als Ursache divergierender Aussagen zur Knorpelregeneration. *Wiss Z d Humboldt Universität zu Berlin, Math nat R XXVIII* 1 (1979) 63-65
50. Poussa M, Rubak J, Ritsilä V: Differentiation of the osteochondrogenic cells of the periosteum in chondrogenic environment. *Acta Orthop Scand* 52 (1981) 235-239
51. Redl H, Schlag G: Fibrinkleber - Methoden und Anwendungen. In: Cotta H, Braun A (Hrsg): *Fibrinkleber in Orthopädie und Traumatologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1982, S. 286-289

52. Regling GG, Wellmitz I, Schildhaus A, Piotraschke A: Regenerationsverhalten des Gelenkknorpels nach mechanischer und kryochirurgischer Läsion am Kniegelenk von Kaninchen. *Wiss Z d Humboldt Universität zu Berlin, Math nat R XXVIII 1* (1979) 53-57
53. Ritsilä V, Alhopuro S, Rintala A: Bone formation with free periosteum. An experimental study. *Scand J Plast Reconstr Surg 6* (1972) 51-56
54. Ritsilä V, Alhopuro S, Rintala A: Bone formation with free periosteal grafts in reconstruction of congenital maxillary clefts. *Ann chir gynecol 65* (1976) 342-351
55. Ritsilä V, Alhopuro S: Reconstruction of experimental tracheal cartilage defects with free periosteum. *Scand J Plast Reconstr Surg 7* (1973) 116-119
56. Ritsilä V, Poussa M, Rubak J, Snellman O, Osterman K: Periosteal and perichondreal grafts in reconstruction of joint surfaces. *Acta Orthop Scand 52* (1981) 447
57. Ritsilä V, Santavirta S, Alhopuro S, Poussa M, Jaroma H, Rubak JM, Eskola A, Hoikka V, Snellman O, Osterman K: Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery. *Clin Orthop 302* (1994) 259-65
58. Rubak JM (a): Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects in free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop Scand 53* (1982) 181-186
59. Rubak JM (b): Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. An experimental study. *Acta Orthop Scand 53* (1982) 175-180
60. Rubak JM: Osteochondrogenesis of free periosteal grafts in the rabbit iliac crest. *Acta Orthop Scand 54* (1983) 826

61. Rubak JM, Poussa M, Ritsilä V: Effect of joint motion on the repair of articular cartilage with free periosteal grafts. *Acta Orthop Scand* 53 (1982) 187-191
62. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMicheal, Clements ND: The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage: An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 62 (1980) 1232
63. Salter RB, Bell RS, Keeley: The protective effect of continuous passive motion on living articular cartilage in acute septic arthritis: An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 159 (1981) 223-247
64. Snellman O, Östermann K, Ritsilä V: Spinal fusion of idiopathic scoliosis with free periosteal grafts. *Acta Orthop Scand* 48 (1977) 339
65. Sohn S, Ohlsen L: Growth of cartilage from a free perichondrial graft placed across a defect in a rabbit's trachea. *Plast Reconstr Surg* 53 (1974) 55-60
66. Stegemann H, Stalder K: Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 18 (1967) 267-273
67. Stock W, Hierner R, Wolf K: Das vaskularisierte Periostlappentransplantat. Ein Überblick über eine neue Therapiemöglichkeit. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 23 (1991) 149-156
68. Takato T, Harii K, Nakatsuka T, Ueda K, Ootake T: Vascularized periosteal grafts: an experimental study using two different forms of tibial periosteum in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 78 (1986) 489-497
69. Tiedtke R, Rahmzadeh R, Hahn F: Tierexperimentelle Studie über Wundspülung bei Knochenoperationen. *H Unfallheilkunde* 158 (1982) 75-81

70. Tillmann B (a): Binde- und Stützgewebe des Bewegungsapparates. In: Tillmann B, Töndury G (hrsg): Rauber Kopsch, Anatomie des Menschen, Band 1. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987, S.13-48
71. Tillmann B (b): Skelettsystem. In: Tillmann B, Töndury G (hrsg): Rauber Kopsch, Anatomie des Menschen, Band 1. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987, S.51-121
72. Urist MR, McLean F: Osteogenic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Jt Surg* 34 (1952) 443-451
73. Vachon Am, Mc Ilwraith CW, Trotter GW, Norrdin BE, Powers BE: Morphologic study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts. *Am J Vet Res* 52 (1991) 317-327
74. Wellmitz G: Zur Wiederherstellung von Gelenkabschnitten durch Regeneration. *Wiss Z d Humboldt Universität zu Berlin, Math nat R XXVIII* 2/3 (1974) 323-335
75. Wellmitz G: Zur Regeneration und Adaptation von Gelenken in Experiment und Klinik. *Nova Acta Leopoldina* 44 (1976) 350-352
76. Wildenberg van den FAJM, Goris RJA, Boetes C: Revascularized periosteum transplantation. *Eur Surg Res* 15 (1983) 110-113
77. Wirth T, Byers S, Byard RW, Hopwood JJ, Foster BK: The implantation of cartilaginous and periosteal tissue into growth plate defects. *Int Orthop* 18 (1994) 220-228
78. Woessner JF: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93 (1961) 440-447

8 Anlagen

Meßwerte zu Punkt 3.4.1 Einfluß potentieller Störfaktoren

Probe	Zusatz	ΔE (565 nm)			Mittelwert
1	nein	0,461	0,462	0,461	0,461
1	ja	0,930	0,934	0,9330	0,932
2	nein	0,385	0,385	0,385	0,385
2	ja	0,888	0,882	0,8820	0,884
3	nein	0,339	0,338	0,338	0,338
3	ja	0,853	0,853	0,8530	0,853
4	nein	0,373	0,381	0,384	0,379
4	ja	0,854	0,853	0,8530	0,853
5	nein	0,282	0,292	0,288	0,287
5	ja	0,796	0,790	0,7950	0,794
6	nein	0,190	0,191	0,190	0,190
6	ja	0,732	0,732	0,7320	0,732

Meßwerte zu Punkt 3.4.3 Temperatureinfluß auf die Hydroxyprolinbestimmung

Probe		ΔE (565 nm)		Mittelwert
Kontrolle	0,591	0,594	0,586	0,590
	0,593	0,588	0,592	0,591
	0,594	0,600	0,599	0,598
erhitzt	0,592	0,592	0,593	0,592
	0,598	0,602	0,605	0,602
	0,594	0,598	0,594	0,595
abgekühlt	0,59	0,598	0,594	0,594
	0,584	0,592	0,59	0,589
	0,607	0,61	0,607	0,608
	0,598	0,602	0,602	0,601
	0,588	0,592	0,59	0,590

Meßwerte zu Punkt 4.2.2 Wassergehalt der Gewebeproben

Kontrollgruppe:

KG Nr.:	Feuchtgewicht in mg	Trockengewicht in mg.	Wassergehalt in %
11 li	13,2	3,6	72,7
12 li	10,2	2,8	72,5
13 li	3,8	0,8	78,9
14 li	11,6	3,1	73,3
15 li	8,0	2,0	75,0
16 li	3,9	1,3	66,7
17 li	4,5	1,8	60,0
18 li	3,1	1,3	58,1
19 li	2,4	1,0	58,3
20 li	2,8	1,1	60,7
21 li	4,1	0,9	78,0
22 li	4,8	1,7	64,6
23 li	8,0	2,2	72,5
24 li	3,9	1,5	61,5
25 li	9,6	2,5	74,0
26 li	5,7	2,1	63,2
27 li	5,9	2,1	64,4
28 li	5,4	2,1	61,1

freie Transplantate:

KG Nr.:	Feuchtgewicht in mg	Trockengewicht in mg	Wassergehalt in %
11 re	20,4	5,1	75,0
12 re	13,5	3,6	73,3
13 re	10,6	2,6	75,5
14 re	35,0	4,1	88,3
18 re	7,7	1,5	80,5
21 re	10,5	3,1	70,5
26 re	2,5	0,8	68,0
28 re	6,6	2,5	62,1

gefäßgestielte Transplantate:

KG Nr.:	Feuchtgewicht in mg	Trockengewicht in mg	Wassergehalt in %
10 re	18,3	6,5	64,5
15 re	8,4	1,6	81,0
16 re	6,2	2	67,7
17 re	11,2	3,1	72,3
19 re	15,9	4,2	73,6
20 re	14,1	4,1	70,9
22 re	12,5	4,3	65,6
23 re	18,5	4,6	75,1
24 re	8,7	2,3	73,6
25 re	16,0	3,9	75,6
27 re	27,8	6,9	75,2

Ergebnisse zu Punkt 4.2.3 Gesamtkollagengehalt der Gewebeproben

Kontrollgruppe:

KG Nr.:	ΔE (565 nm)			Mittelwert
11 li	0,265	0,265	0,269	0,266
12 li	0,385	0,385	0,385	0,385
13 li	0,168	0,168	0,167	0,168
14 li	0,373	0,381	0,384	0,379
15 li	0,282	0,292	0,288	0,287
16 li	0,190	0,191	0,190	0,190
17 li	0,241	0,243	0,248	0,244
18 li	0,173	0,172	0,174	0,173
19 li	0,163	0,165	0,162	0,163
20 li	0,293	0,297	0,295	0,295
21 li	0,176	0,177	0,176	0,176
22 li	0,255	0,256	0,259	0,257
23 li	0,356	0,361	0,362	0,360
24 li	0,230	0,230	0,233	0,231
25 li	0,330	0,341	0,338	0,336
26 li	0,312	0,318	0,315	0,315
27 li	0,274	0,270	0,270	0,271
28 li	0,234	0,234	0,234	0,234

freie Transplantate:

KG Nr.:	ΔE (565 nm)			Mittelwert
11 re	0,388	0,381	0,383	0,384
12 re	0,461	0,462	0,461	0,461
13 re	0,339	0,338	0,338	0,338
14 re	0,475	0,475	0,477	0,476
18 re	0,162	0,162	0,164	0,163
21 re	0,404	0,409	0,409	0,407
26 re	0,170	0,170	0,172	0,171
28 re	0,198	0,197	0,193	0,196

gefäßgestielte Transplantate:

KG Nr.:	ΔE (565 nm)			Mittelwert
10 re	0,626	0,645	0,635	0,635
15 re	0,254	0,263	0,269	0,262
16 re	0,319	0,319	0,324	0,321
17 re	0,475	0,480	0,494	0,483
19 re	0,562	0,566	0,570	0,566
20 re	0,586	0,584	0,587	0,586
22 re	0,464	0,464	0,469	0,466
23 re	0,637	0,649	0,654	0,647
24 re	0,354	0,360	0,360	0,358
25 re	0,613	0,628	0,629	0,623
27 re	0,802	0,803	0,813	0,806

9 Thesen

1. Gefäßgestielte Periostlappen adulter Kaninchen sind unter den Bedingungen einer Spontanbewegung in der Lage, sich in osteochondralen Kniegelenkdefekten in hyalinknorpelähnliches Gewebe zu differenzieren.
2. Voraussetzung für das Gelingen der Transplantation ist eine "scharfe" Periostentnahme mit Skalpell und Raspatorium, bei der die Kambiumzellschicht am Transplantat verbleibt.
3. Die Fixationsmethode der Fibrinklebung führt bei spannungsfreier Adaptation und Überschussentfernung zu ausreichender Transplantathaftung im Defekt.
4. Eine postoperative Ruhigstellung der Gelenke zum Transplantatschutz ist nicht erforderlich und wegen der Inhibition der Neochondrogenese abzulehnen, da die biomechanische Belastung der Transplantate von wesentlicher Bedeutung für die strukturelle Differenzierung ist.
5. Gefäßgestielte Periostlappen zeigen in der Rekonstruktion osteochondraler Gelenkflächendefekte nach einem Zeitraum von sechs Monaten deutlich weniger degenerative Veränderungen als freie Transplantate.
6. Degenerative Veränderungen im Neoknorpel deuten auf eine biologische Minderwertigkeit des neugebildeten Gewebes im Vergleich zum originären Gelenknorpel hin.
7. Durch das Regenerat gefäßgestielter Periostlappen wird ein osteochondraler Defekt in voller Höhe ersetzt, die transversale Einbindung in den Umgebungsknorpel ist nicht optimal.

8. Durch gefäßgestielte Priostlappentransplantate ist im Tiermodell eine Versuchsanordnung geschaffen, die im klinischen, histologischen und biochemischen Bild dem der freien Transplantation deutlich überlegen ist.
9. Veränderungen der Versuchsbedingungen im Sinne einer weiteren Annäherung an embryonale und postnatale Wachstumsbedingungen können zu einer strukturellen Angleichung des Neoknorpels an hyalinen Gelenknorpel und damit zu einer klinisch relevanten Behandlungsmethode führen.
10. Durch Verwendung gefäßgestielter Periostlappen bei adulten Kaninchen wird im Defekt ein Stoffwechsellmilieu geschaffen, welches dem adoleszenter Tiere ähnlich erscheint und das reduzierte chondrogenetische Potenzial freier Transplantate adulter Tiere übersteigt.

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Markus Berginski
Anschrift	Brandenburger Straße 6 06114 Halle/Saale
geboren am	02.03.1971 in Iserlohn als zweites Kind der Eheleute Hedwig Berginski und Werner Berginski.
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
08.1977-07.1981	Besuch der „Städtischen Gemeinschaftsgrundschule“ in Werdohl-Kleinhammer.
09.1981-06.1991	Besuch des „Bergstadt-Gymnasiums“ der Stadt Lüdenscheid.
07.1991-09.1992	Im Rahmen des Zivildienstes Berufsausbildung zum Rettungssanitäter bei der Johanniter-Unfallhilfe in Werdohl.
10.1992-12.1993	Berufsausbildung zum Zahntechniker bei der Firma „Seuthe Zahntechnik“ in Plettenberg. Abbruch der Ausbildung um das Studium der Humanmedizin aufzunehmen.
12.1993-10.1999	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
seit 10.1998	Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
11.1995-02.1998	Nebentätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im anatomischen und neuroanatomischen Kurs des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
10.1996-04.1998	Studentische Aushilfe im Universitätsklinikum Kröllwitz auf der Intensivtherapiestation der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- 10.1999-04.2001** Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Schubert.
- seit 01.1997** Aufnahme einer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hein; Arbeitstitel: „Deckung osteochondraler Gelenkflächendefekte durch gefäßgestielte Periostlappen - eine experimentelle Studie am Kaninchenkniegelenk.“
- seit 04.2001** Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Schubert.

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Markus Berginski